

Univerzitet u Nišu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za hemiju

Katarina Vučićević-Prčetić

***Određivanje aminoglikozidnih antibiotika i njihovih
nečistoća primenom tečne hromatografije sa maseno-
masenom spektrometrijom***

Doktorska disertacija



PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

NIŠ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj, RBR:	
Identifikacioni broj, IBR:	
Tip dokumentacije, TD:	monografska
Tip zapisa, TZ:	tekstualni
Vrsta rada, VR:	Doktorska disertacija
Autor, AU:	Katarina Vučićević-Prčetić
Mentor, MN:	Niko Radulović
Naslov rada, NR:	Određivanje aminoglikozidnih antibiotika i njihovih nečistoća primenom tečne hromatografije sa maseno-masenom spektrometrijom
Jezik publikacije, JP:	srpski
Jezik izvoda, JI:	srpski i engleski
Zemlja publikovanja, ZP:	Srbija
Uže geografsko područje, UGP:	Srbija
Godina, GO:	2011.
Izdavač, IZ:	autorski reprint
Mesto i adresa, MA:	Niš, Višegradska 33
Fizički opis rada, FO: (poglavlja/ strana/ citata/ tabela/ slika/ grafika/ priloga)	11 poglavlja, 84 strane, 55 citata, 35 tabela, 36 slika
Naučna oblast, NO:	Hemija
Naučna disciplina, ND:	Organska hemija i biohemija
Predmetna odrednica/Ključne reči, PO:	Gentamicin, linkomicin, neomicin, spektinomicin, oksitetraciklin, LC MS/MS, nečistoće
UDK	577.181.3: 543.544.5 + 543.51
Čuva se, ĆU:	Biblioteka
Važna napomena, VN:	Disertacija je rađena u laboratorijama FM Pharm-a, Subotica
Izvod, IZ:	Primenom tečne hromatografije sa maseno-masenom spektrometrijom (LC/MS/MS), razvijene su i testirane metode za određivanje gentamicina, linkomicina, spektinomicina, streptomicina, dihidrostreptomicina, neomicina i oksitetraciklina u prisustvu njihovih nečistoća. Hromatografsko razdvajanje je postignuto primenom graduentnog eluiranja na C18 koloni. Sve komponente su jonizovane pozitivnom elektro-sprej modu, a detektovane u modu <i>multireaction monitoring-a</i> (MRM) korišćenjem maseno-masenog detektora. Dobijene kalibracione krive su linearne sa koeficijentom korelacije boljim od 0,99. Sve nečistoće definisane u farmakopejama, za sve aktivne komponente, su određene i njihov identitet potvrđen. Razvijene metode su testirane u rutinskoj kontroli kvaliteta.
Datum prihvatanja teme, DP:	
Datum odbrane, DO:	
Članovi komisije,	Predsednik:
član:	
Član:	
Član:	
Član, mentor:	



PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

NIŠ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	monograph
Type of record, TR:	textual / graphic
Contents code, CC:	doctoral dissertation
Author, AU:	Katarina Vučićević-Prčetić
Mentor, MN:	Niko Radulović
Title, TI:	Determination of aminoglycoside antibiotics and their impurities by liquid chromatography tandem mass spectrometry
Language of text, LT:	Serbian
Language of abstract, LA:	Serbian and English
Country of publication, CP:	Serbia
Locality of publication, LP:	Serbia
Publication year, PY:	2011
Publisher, PB:	author's reprint
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD: (chapters/pages/ref/tables/pictures/graphs/applications)	11 chapters, 84 pages, 55 citation, 35 tables, 36 pictures
Scientific field, SF:	Chemistry
Scientific discipline, SD:	Organic Chemistry and Biochemistry
Subject/Key words, S/KW:	Gentamicin, lincomycin, neomycin, spectinomycin, oxytetracyclin, LC MS/MS, impurities
UC	577.181.3: 543.544.5 + 543.51
Holding data, HD:	Library
Note, N:	A part of the thesis was done in the laboratory of FM Pharm,
Abstract, AB:	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) methods for the determination of gentamicin, lincomycin, spectinomycin, streptomycin, dihydrostreptomycin, neomycin and oxytetracycline in the presence of their impurities were developed and tested. Chromatographic separations were achieved using a gradient elution on a C ₁₈ column. All components were ionized by positive-ion electrospray and detected by multireaction monitoring (MRM) with an LC-tandem mass spectrometer. Calibration curves were linear with correlation coefficients better than 0.99. All impurities defined in the pharmacopoeias for all active components were determined and their identities confirmed. The
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	
Defended on, DE:	
Defended Board,	President:
	Member:
	Member:
	Member, Mentor:

Ova doktorska disertacija rađena je na Departmanu za hemiju Prirodnog matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu i u laboratoriji FM Pharm-a iz Subotice. Problematika obrađivana u ovoj tezi deo je istraživanja projekta br. 172061 koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

Izradom rada rukovodio je doc Niko Radulović, docent Prirodnog matematičkog fakulteta u Nišu, koji me je svesrdno i nesebično savetovao u svim fazama izrade rada. Zato mu ovim putem izražavam iskrenu i najtopliju zahvalnost za svu pomoći, vreme, strpljenje, podršku i prijateljstvo.

Naročitu zahvalnost izražavam prof dr Vesni Matović, redovnom profesoru Farmaceutskog fakulteta u Beogradu na velikom interesovanju i savetima koje mi je pružila tokom izrade ovog rada.

Posebno se zahvaljujem dr Radosavu Paliću, redovnom profesoru Prirodno matematičkog fakulteta u Nišu i dr Polini Blagojević, docentu Prirodno matematičkog fakulteta u Nišu na pruženoj podršci, korisnim savetima i sugestijama pri izradi ovog rada.

Svoju zahvalnost dugujem i kolegama iz FM Pharm-a, Subotica, pre svega na saradnji, podršci i pomoći u tehničkom izvođenju eksperimentalnog dela rada. Takođe, zahvaljujem se i kolegama iz "DSP Chromatography" iz Beograda na podršci i korisnim savetima.

Na posletku, neizmerno i iz nebrojeno mnogo razloga, zahvaljujem se svojoj porodici.

SADRŽAJ

1	SKRAĆENICE.....	1
2	UVOD	2
2.1	Aminoglikozidni antibiotici.....	3
2.1.1	Uvod	3
2.1.2	Mehanizam dejstva.....	4
2.1.3	Rezistencija.....	5
2.1.4	Terapijska primena	5
2.1.5	Sporedni efekti.....	5
2.2	Gentamicin.....	6
2.3	Spektinomicin	7
2.4	Streptomicin.....	8
2.5	Neomicin.....	9
2.6	Linkomicin.....	9
2.7	Značaj određivanja aminoglikozidnih antibiotika	9
2.8	Metode određivanja aminoglikozidnih antibiotika	11
3	Cilj rada.....	14
4	Eksperimentalni deo.....	16
4.1	Instrumentacija.....	16
4.2	Uzorci.....	16
4.2.1	Parametri metode za određivanje gentamicina.....	17
4.2.2	Parametri metode za određivanje linkomicina	19
4.2.3	Parametri metode za određivanje spektinomicina.....	20
4.2.4	Parametri metode za određivanje neomicina.....	22
4.2.5	Parametri metode za određivanje streptomicina.....	23
4.2.6	Parametri metode za određivanje dihidrostreptomicina	25
4.2.7	Parametri metode za određivanje oksitetraciklina.....	26
5	Rezultati i diskusija.....	29

5.1	Određivanje gentamicin-sulfata.....	30
5.1.1	Validacija metode za određivanje gentamicin-sulfata.....	32
5.1.2	Analiza uzoraka koji sadrže gentamicin-sulfat.....	37
5.2	Određivanje linkomicin-hidrohlorida i spektinomicin-dihidrohlorida	38
5.2.1	Validacija metode.....	40
5.2.2	Analiza uzoraka linkomicina i spektinomicina	45
5.3	Određivanje neomicin-sulfata.....	47
5.3.1	Validacije metode za određivanje neomicina.....	48
5.3.2	Analiza uzoraka neomicina	51
5.4	Odredivanje oksitetraciklin-hidrohlorida.....	52
5.4.1	Validacija metode za određivanje oksitetraciklin-hidrohlorida	54
5.4.2	Analiza uzoraka oksitetraciklina	57
5.5	Određivanje streptomycin-sulfata.....	58
5.5.1	Validacije metode za određivanje streptomicina.....	59
5.5.2	Analiza uzoraka streptomicina	62
5.6	Određivanje dihidrostreptomycin-sulfata	62
5.6.1	Validacije metode za određivanje dihidrostreptomicina	64
5.6.2	Analiza uzoraka dihidrostreptomicina.....	66
6	Zaključak.....	67
7	Izvod.....	70
8	Summary	73
9	Literatura	76
10	Biografija	81
11	Bibliografija	83

1 SKRAĆENICE

EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care

ELSD – evaporative light scattering detektor

ESI – elektrospej ionizacija na atmosferskom pritisku

HFBA – heptafluorobuterna kiselina

HPLC – visoko efikasna tečna hromatografija

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

LC/MS/MS – tečna hromatografija sa maseno-masenom spektrometrijom

LOD – limit detekcije

LOQ – limit kvantifikacije

MAA – merkaptosirćetna kiselina

MRM – multiple reaction monitoring

MS/MS – maseno-masena

OPA – o-ftalaldehidom

QQQ – triple quadrupole maseni spektrometar

RNK – ribonukleinska kiselina

rRNK – ribozomalna ribonukleinska kiselina

TEA – trietilamin

TFA – trifluorosirćetna kiselina

2 UVOD

Antibiotici predstavljaju grupu mikrobioloških metabolita ili njihovih sintetskih analoga koji, bez ozbiljnih toksičnih efekata po domaćina, inhibiraju rast, razmnožavanje i opstanak mikroorganizama. Antibiotici spadaju među najčešće korišćene lekove iako je njihova efikasnost umanjena usled razvoja rezistencije nastale zbog evolucije mikroorganizama i pogrešne upotrebe lekova. U mnogim slučajevima, problemi sa rezistencijom se rešavaju manipulacijom originalne strukture, što najčešće dovodi do šireg spektra dejstva, većeg potencijala, manje toksičnosti, lakšeg načina primene i dodatnih farmakokinetičkih prednosti. (Williams D.A, 2008)

Efikasnost antibiotika takođe zavisi od dostupnosti slobodne forme antibiotika u krvi što je direktno vezano sa stepenom njihovog vezivanja za proteine plazme. Smatra se da procenat antibiotika koji je vezan za proteine plazme nije dostupan u trenutku tretmana infekcije i stoga mora biti oduzet od ukupne koncentracije u krvi kako bi se dobila efektivna koncentracija u krvi. Jačina vezivanja za proteine je takođe bitna pošto brzina oslobođanja antibiotika iz kompleksa sa proteinima plazme određuje dostupnost antibiotika u različitim tkivima kao i mogućnost stvaranja depo izvora antibiotika za duže dejstvo. Ove karakteristike antibiotika su definisane preko njihovog farmakokinetičkog profila koji omogućava postavljanje boljih režima doziranja. (Williams D.A, 2008)(Remers, 2004)

U idealnim uslovima, poželjno je da postoje parenteralna i oralna forma antibiotika. Iako je oralna primena najpogodnija, u težim slučajevima često se zahteva parenteralna terapija. Stoga bi bilo poželjno imati dostupne lekove u obe dozirane forme.

Antibiotici se koriste kao monoterapija ili u kombinovanom terapijskom režimu. Logična je pretpostavka da kombinovanje antibiotika ima prednost nad individualnom primenom pošto bi ovo proširilo antimikrobni spektar dejstva i time bi se smanjila neophodnost precizne identifikacije patogena. Međutim, utvrđeno je da su u mnogim slučajevima takve kombinacije sa antagonističkim dejstvom. Opšta generalizacija, koja međutim nije uvek tačna, je da se mogu uspešno kombinovati dva baktericidna antibiotika, naročito ako imaju različite mehanizme dejstva. Jednostavan primer ovakve interakcije je primena β-laktamskih antibiotika i aminoglikozida gde su obe familije antibiotika baktericidne u koncentracijama koje se mogu dostići parenteralnom primenom. β-laktamski antibiotici inhibiraju formiranje ćelijskog zida dok se aminoglikozidi uključuju u metaboličke puteve povezane sa biosintezom proteina i utiču na funkciju membrane, pa se njihovi načini delovanja dopunjavaju. Međutim, u ovom slučaju dolazi do međusobne interakcije antibiotika i uzajamnog inaktiviranja pa je ovakva kombinovana terapija zamenjena odgovarajućim monoterapijama.

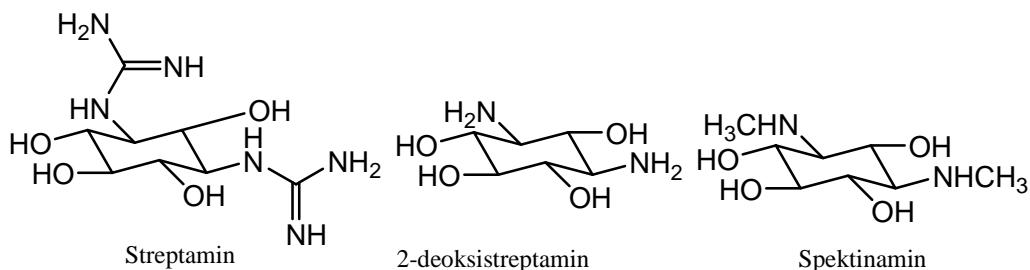
Zbog brzog razmnožavanja bakterija (populacija se obično duplira za period od 0.5 – 3 sata) bitno je uvesti antibiotsku terapije što je pre moguće. Često u praksi terapija započinje sa duplom dozom a potom se nastavlja sa manjim dozama za održavanje nivoa koncentracije leka u krvi. Da bi se sprečilo ponovno javljanje infekcije, pacijentu se preporučuje da ne preskače doze i da upotrebi kompetnu količinu prepisanog leka čak i ako simptomi prestanu. Najčešće su neuspeh terapije i stvaranje rezistencije uzrokovani lošom usklađenošću ili prevremenim prestankom primene terapije od strane pacijenta. (Williams D.A, 2008)(Remers, 2004)

Antibiotici se često koriste profilaktički u slučajevima kao što su preoperativna asanacija creva ili virusna upala grla. Češća profilaktička primena antibiotika je prisutna u veterinarskoj medicini gde se primenjuje kolektivni tretman svih životinja u okruženju od kojih su samo neke obolele ali su u kontaktu sa ostalima i postoji velika verovatnoća da će doći do zaraze. Način aplikovanja leka je uglavnom kroz hranu ili vodu koju konzumiraju i obbolele i zdrave životinje. (Williams D.A, 2008)(Remers, 2004)

2.1 Aminoglikozidni antibiotici

2.1.1 Uvod

Klasa aminoglikozidnih antibiotika sadrži farmakofornu 1,3-diaminoinositolsku grupu u koju spadaju streptamin, 2-deoksistreptamin ili spektinamin (Slika 1). Pojedine alkoholne funkcionalne grupe 1,3-diaminoinositola su supstituisane preko glikozidnih veza karakterističnim amino šećerima i formiraju pseudo-oligosaharide. Hemijske osobine, spektor dejstva, potencijal, toksičnost i farmakokinetika ovih agenasa su funkcija specifičnih vrsta diaminoinositskih jedinica koje ulaze u njihov sastav i vrste i orientacije supstituenata.



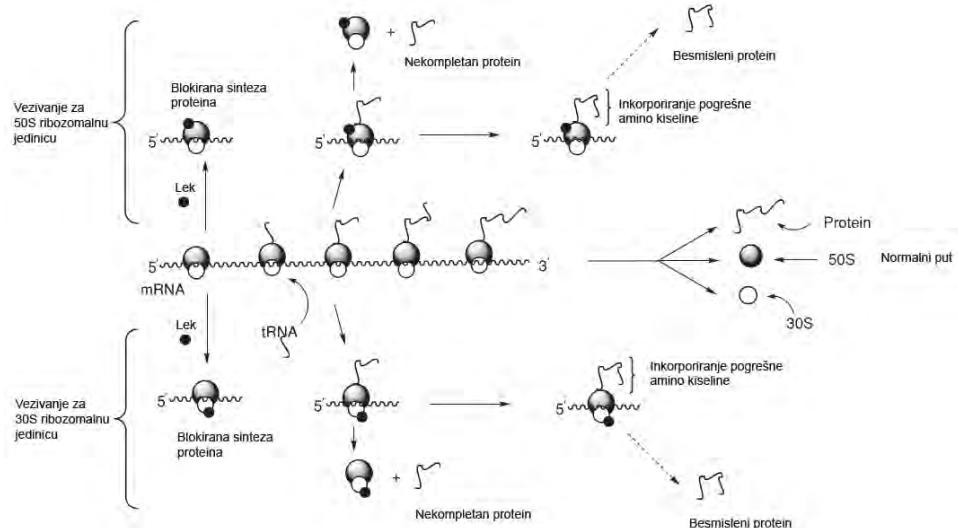
Slika 1. Različite 1,3-Diaminoinositoske grupe koje ulaze u sastav aminoglikozida

Različiti aminoglikozidni antibiotici su dobro rastvorljivi u vodi na svim pH vrednostima, predstavljaju bazna jedinjenja koja sa kiselinama grade soli, slabo se absorbuju iz gastrointestinalnog trakta i eliminišu se u aktivnoj formi u prilično visokim koncentracijama preko urina ubrzo nakon davanja injekcije. U slučajevima kada bubrezi ne funkcionišu efikasno, doza mora biti smanjena kako bi se sprečila akumulacija do toksičnih koncentracija. Kada se aplikuju oralno, primarno se očekuje dejstvo u gastrointestinalnom traktu. Međutim,

najčešće se primenjuju intramuskularno. U skorije vreme za tretman infekcija *Pseudomonas aeruginosa* kod pacijenata sa cističnom fibrozom, pokušana je aplikacija tobramicina raspršivanjem u pluća. Ovaj način primene leka je rezultirao značajnim smanjenjem toksičnih efekata kod pacijenata. Ovi agensi imaju značajno širok spektar dejstva ali njihova toksičnost ograničava njihovu kliničku primenu na česte infekcije gram-negativnim bakterijama. Aminoglikozidni antibiotici su u organizmu nakon primene široko rasprostranjeni, uglavnom u ekstracelularnoj tečnosti, i imaju nizak afinitet za vezivanje za proteine plazme.

2.1.2 Mehanizam dejstva

Aminoglikozidi su baktericidni zbog kombinacije efekata koje imaju na bakterije. U nižim dozama, vezuju se za 16S rRNK jedinicu 30S ribozomalne podjedinice narušavajući funkciju ribozoma. Konformacione promene nastaju na peptidil A mestu ribozoma gde je vezan aminoglikozid. Ovo dovodi do pogrešne transkripcije RNK sekvence i za posledicu ima pogrešan izbor amino kiselina i formiranja takozvanih besmislenih proteina (Slika 2). Najvažniji od ovih neprirodnih proteina su uključeni u ometanje funkcije membrane bakterije. Njihovo prisustvo uništava semipermeabilnost membrane. Ovo oštećenje ne može biti popravljeno bez novog programiranja biosinteze proteina. Među supstancama koje su absorbovane usled oštećenja membrane su dodatne velike količine aminoglikozida. U ovim povećanim koncentracijama, biosinteza proteina potpuno prestaje. Ovi kombinovani efekti su kobni za ciljne bakterijske ćelije. Posmatrajući njihovu visoku polarnost, očekivalo bi se da uopšte ne mogu da prodru unutar bakterijske ćelije. Aminoglikozidi se očigledno inicijalno vezuju za eksterne lipopolisaharide i difunduju u ćeliju u malim količinama. Proces preuzimanja je inhibiran Ca^{2+} i Mg^{2+} jonima pa su ovi joni stoga parcijalno terapijski inkompatibilni. U visokim koncentracijama, eukariotska biosinteza proteina može biti inhibirana aminoglikozidnim antibioticima. (Williams D.A, 2008)(Remers, 2004)



Slika 2. Generalni mehanizam dejstva lekova koji blokiraju sintezu proteina vezivanjem za ribozomalnu jedinicu

2.1.3 Rezistencija

Rezistencija bakterija na aminoglikozidne antibiotike je najčešće rezultat enzimski posredovane reakcije, koja za posledicu ima sprečavanje njegovog vezivanja za ribozom. U nekim slučajevima, uklanjanjem/modifikacijom funkcionalnih grupa posredstvom enzima nastaje molekul koji je i dalje antibiotik ali više nije substrat. Na ovaj način, agensi sa značajno širim spektrom dejstva mogu se dobiti polusintetski. U nekim drugim slučajevima, nove funkcionalne grupe mogu biti vezane čime menjaju njihovu funkcionalnost, tako da ovi antibiotici postaju slabi substrati za enzime koji razvijaju rezistenciju i ovo širi njihov spektar dejstva. Rezistencija može da uključuje i mutacije na ribozomalnom A mestu ili smanjenje unosa aminoglikozida u ćeliju bakterije. (Williams D.A, 2008)(Remers, 2004)

2.1.4 Terapijska primena

Aminoglikozidni antibiotici imaju širok spektar dejstva protiv aerobnih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija ali se u praksi primenjuju kod ozbiljnih infekcija izazvanih gram-negativnim organizmima, zbog ozbiljne toksičnosti koja se često javlja sa odloženim dejstvom. Aktivni su protiv gram-negativnih aeroba poput *Acinetobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus vulgaris*, *Providencia sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Serratia marscesans*, *Shigella sp.*, i gram-pozitivnih aeroba (kao *Staphylococcus epidermidis*).

Streptomycin i spektinomicin se razlikuju od ostalih aminoglikozidnih antibiotika po njihovom antimikrobnom spektru dejstva. Streptomycin se najčešće koristi za lečenje tuberkuloze a spektinomicin u tretmanu gonoreje. Ostali antibiotici iz ove klase nisu efikasni u ovim slučajevima. (Remers, 2004)(Williams D.A, 2008)

2.1.5 Sporedni efekti

Neželjeni sporedni efekti koji se mogu javiti pri aplikovanju aminoglikozidnih antibiotika su uglavnom rezultat alergijske reakcije ili predoziranja leka. Ozbiljni toksični efekti usled jednog akutnog predoziranja su veoma retki ali ukoliko do njih dođe, toksičnost je obično uzrokvana proširenjem farmakoloških efekata ili alergijskom reakcijom. Takođe, toksičnost može biti povećana usled interakcije sa lekovima koji se istovremeno primenjuju ukoliko dođe do inhibiranja metabolizma antibiotika. Kod akutnog predoziranja, većina antibiotika uzrokuje mučninu, povraćanje i dijareju.

U slučajevima predoziranja leka, od posebnog značaja postaje određivanje koncentracije leka u serumu koja se poredi sa poznatim terapijskim koncentracijama leka. Za poređenje se koriste literarni podaci koji su za određene aminoglikozidne antibiotike prikazani u Tabeli 1. (Kent R. Olson, 2004)

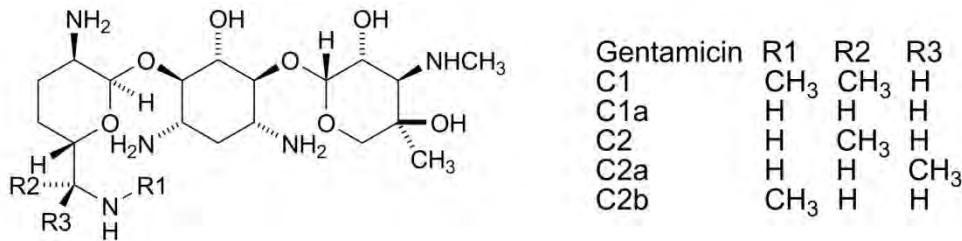
Tabela 1. Aminoglikozidni antibiotici i njihova toksičnost

Aminoglikozidni antibiotic	Vreme poluživota $t_{1/2}$ (h)	Koncentracija u serumu (mg/L)	Toksičnost
Amikacin	2–3	> 35	
Gentamicin	2	> 12	
Kanamicin	2–3	> 30	
Neomicin		0,5–1	
Streptomycin	2,5	> 40–50	
Tobramicin	2–2,5	> 10	
Klindamicin	4,4–6,4	Nepoznate	Hipotenzija i kardiopulmonarni zastoj nakon brze intravenske primene
Linkomicin	2,4–3		

Faktori rizika koji su povezani sa toksičnim efektima aminoglikozidnih antibiotika, najčešće su vezani za karakteristike pacijenata poput starosti, problemima sa renalnom funkcijom, oštećenjem jetre, hiptenzijom, šokom, prethodnim tretmanima aminoglikozidima. Takođe su povezane i sa načinom primene leka (visoke dnevne doze, dugotrajni tretman i kratki vremenski intervali između pojedinačnih doza). (Kent R. Olson, 2004)

2.2 Gentamicin

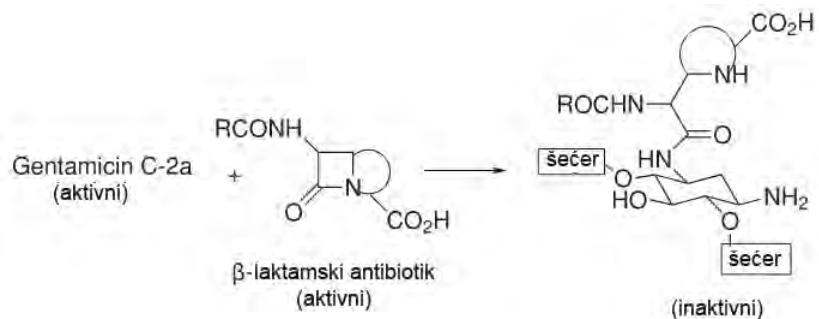
Gentamicin predstavlja smešu nekoliko antibiotskih komponenti koje se dobijaju fermentacijom iz *Micromonospora purpurea* i drugih srodnih sojeva mikroorganizama. Gentamicini C-1, C-2 i C-1a su najzastupljeniji.



Slika 3. Struktura gentamicina

Ovo je najznačajniji aminoglikozidni antibiotik koji je još uvek u primeni. To je ujedno bio prvi antibiotik za koji je utvrđeno da je efikasan kod infekcija izazvanih sojevima *Pseudomonas aeruginosa*. U strukturi gentamicina nema funkcionalnih grupa koje bi ga učinile pogodnim supstratom za enzime koji prouzrokuju rezistenciju, pa je njegov antibakterijski spektar izuzetno širok. Često se koristi u kombinaciji sa drugim antimikrobnim

agensima što može dovesti do nekih neočekivanih interakcija. Sa određenim β -laktam antibioticima dolazi do uzajamne reakcije i stvaranja inaktivnog proizvoda (Slika 4). Zbog ovoga ih ne treba kombinovati u istom rastvoru a ukoliko se kombinuju, treba ih aplikovati u različita tkiva kako bi se sprečila navedena interakcija. Ova interakcija se generalno javlja kod aminoglikozidnih antibiotika.

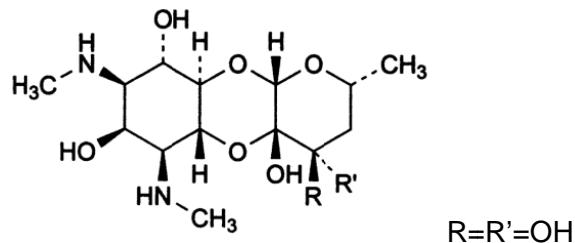


Slika 4. Interakcija gentamicina i β -laktamskog antibiotika

Gentamicin se koristi u lečenju infekcija urinarnog trakta, kod opeketina, nekih pneumonija i kod infekcija uzrokovanih osetljivim gram-negativnim bakterijama koje se javljaju kod preloma. Često se koristi za prevenciju zaprljanosti mekih kontaktnih sočiva i u polimernim matriksima u ortopediji, za prevenciju sepse. Primjenjuje se i površinski, ponekad u posebnim smešama, kod pacijenata sa opeketinama. (Kent R. Olson, 2004)(Remers, 2004)(Williams D.A, 2008)

2.3 Spektinomicin

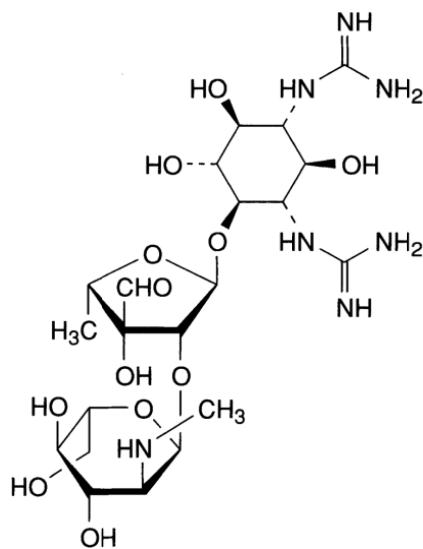
Spektinomicin se dobija fermentacijom *Streptomyces spectabilis* i bitno se razlikuje od ostalih antibiotika iste grupe po svojim kliničkim osobinama. Kod diaminoinozitolske spektinomicinske jedinice, dve mono-N-metil grupe i hidroksilna grupa između njih su međusobno u cis odnosu, zarazliku od odgovarajućih grupa kod streptomicina (Slika 6), gde je pomenuta OH grupa trans orientisana u odnosu na dve imino grupe. Glikozidno povezani šećer je takođe neuobičajen pošto sadrži 3 uzastopne karbonilne grupe, bilo slobodne ili maskirane, i povezan je preko dve veze za spektinamin, što daje neobičnu tricikličnu strukturu (Slika 5). Spektinomicin je bakteriostatik koji se gotovo isključivo koristi u humanoj medicini kao jednokratna intramuskluarna injekcija za tretman *Neisseria gonorrhoea*, naročito kod sojeva rezistentnih na penicilinе, i to kod urogenitalne ili oralne gonoreje. Prema dostupnim podacima, aplikovano na ovaj način ne izaziva značajne oto ili nefrotoksične efekte. Naročito se koristi kod pacijenata alergičnih na penicilinе i kod pacijenata koji se ne mogu lako uklopiti u uobičajenu terapijsku šemu aplikovanja leka. Primena bi mogla biti značajnije šira ali u slučaju sifilisa i hlamidijske infekcije nije efikasan – dolazi do značajne promene translacije ribozomalnim vezivanjem ali ne uzrokuje veću inhibiciju biosinteze proteina. Rezistencija se javlja i usled kinazama posredovane fosforilacije hidroksilne grupe.(Remers, 2004)(Williams D.A, 2008)



Slika 5. Struktura spektinomicina

2.4 Streptomycin

Streptomycin se dobija fermentacijom iz *Streptomyces griseus* i nekoliko srodnih sojeva mikroorganizama. Uveden je u terapiju 1943., primarno za tretman tuberkuloze i za njegovo otkriće je Selmon Waksman dobio Nobelovu nagradu 1952. godine. Streptomycin se razlikuje od tipičnih aminoglikozida po tome što sadrži streptamin kao diaminoinozitolsku jedinicu. Streptomycin takođe sadrži aksijalnu hidroksilnu grupu na C-2 i, umesto primarnih amina prisutnih kod 2-deoksisterptamina, dve veoma bazne gvanidino grupe na C-1 i C-3 (Slika 6). Verovatno je da neuobičajene farmakofore u velikoj meri utiču na specifičan antibakterijski spektar ovog antibiotika. Druga karakteristična strukturna jedinica prisutna u streptomycinu, α -hidkoksialdehidna grupa, čini ovaj antibiotik relativno nestabilnim, pa se preparati koji ga sadrže ne mogu sterilisati autoklaviranjem već se sterilizacija rastvora vrši ultrafiltriranjem. Danas se streptomycin retko koristi, i to uglavnom kao monoterapija. (Williams D.A, 2008)(Remers, 2004)

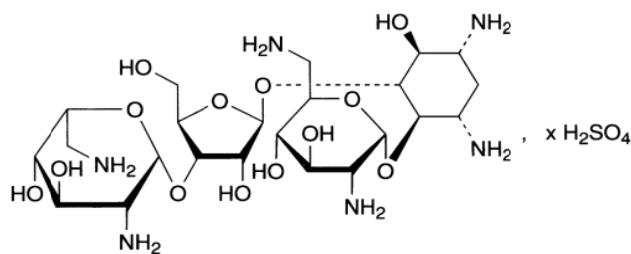


Slika 6. Struktura streptomicina

Rezistencija na streptomycin se razvija uobičajenim mehanizmima N-acetilovanja, O-fosforilovanja i O-adenilovanja specifičnih funkcionalnih grupa.

2.5 Neomicin

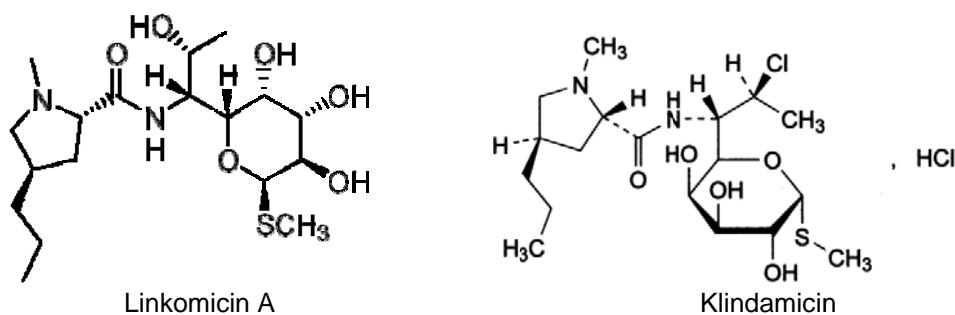
Neomicin predstavlja smešu tri komponente dobijene fermentacijom *Streptomyces fradiae* gde dominira neomicin B. Neomicin predstavlja najčešće korišćeni antibiotik za tretman infekcije creva uključujući infekcije izazvane bakterijom *Escherichia coli*. Takođe se koristi u preparatima za tretman infekcija kože. Kada se primeni na neoštećenu kožu, lek se ne absorbuje ali kada se primeni na veće oštećene površine, dolazi do sistemske apsorpcije i potencijalnih sporednih toksičnih efekata. (Kent R. Olson, 2004)(Williams D.A, 2008)(Remers, 2004)



Slika 7. Struktura neomicin-sulfata

2.6 Linkomicin

Linkomicin je antibiotik koji se dobija fermentacijom iz soja *Streptomyces lincolnensis*. Često se koristi i njegov 7-hloro-7-deoksi derivat, poznat kao klindamicin. Kod linkomicina A šećerna komponenta je vezana amidnom vezom za ostatak stukture što je prikazano na Slici 8.



Slika 8. Struktura linkomicina A i klindamicina

Aplikuje je injekciono i ima duže vreme poluživota kod pacijenata sa oštećenom renalnom funkcijom ili funkcijom jetre. (Remers, 2004)(Williams D.A, 2008)

2.7 Značaj određivanja aminoglikozidnih antibiotika

Aminoglikozidni antibiotici se izoluju kao prirodni proizvodi iz fermentacionih čorbi određenih mikroorganizama, čime se primarno dobijaju ekstrakti među kojima su i aktivni

principi. Ovakav način dobijanja uzrokuje prisustvo srodnih supstanci koje imaju sličnu strukturu, ali mogu imati smanjeni ili čak kontra efekat. Takođe, pored aktivnih principa i srodnih jedinjenja, mogu se naći nečistoće kao posledica samog procesa ekstrakcije. Pored toga, vremenom dolazi do razgradnje aktivnih komponenti u farmaceutskoj formulaciji čime nastaju degradacioni proizvodi, čije prisustvo za posledicu takođe može imati smanjenje efekta ili potenciranje toksičnosti. Stoga je neophodno sprovoditi kontrolu preparata u skladu sa propisanim standardima i kontrolisati kvalitet kako ulazne sirovine, tako i gotovog proizvoda (i u toku formulacije i nakon stajanja proizvoda u toku roka trajanja). Ovakva kontrola je neophodna prema važećim propisima za registrovanje farmaceutskog doziranog oblika, ali i za rutinsku kontrolu kvaliteta svake pojedinačne serije u proizvodnji.

Pomenuta kontrola podrazumeva pre svega pojedinačnu identifikaciju komponenti prisutnih u farmaceutskoj formulaciji, a potom i njihovu kvantifikaciju. Zbog sličnosti u strukturi neophodno je razdvojiti komponente a potom ih pouzdano identifikovati. Identifikacija se olakšana primenom masene spektrometrije za komponente koje imaju različite molekulske mase, dok je kod jedinjenja sa istom molekulskom masom, što je najčešće slučaj kod izomernih struktura, neophodno hromatografsko razdvajanje a potom pojedinačna identifikacija. Kvantifikacija se kod primene masene spektrometrije može raditi nezavisno za komponente različitih masa iako komponente nisu hromatografski prethodno razdvojene.

Pored gotovih doziranih oblika koji se puštaju u promet, ispitivanja obuhvataju i praćenje koncentracija aktivnih komponenti kod pacijenata, kako zbog praćenja farmakokinetičkih osobina preparata, tako i zbog neophodnog praćenja koncentracije leka u slučajevima predoziranja. Adekvatna primena antibiotika podrazumeva održavanje određene koncentracije leka u krvi, što se postiže primenom odgovarajućeg režima doziranja leka. Režim doziranja je uslovljen farmakokinetičkim osobinama aktivne komponente, pre svega brzinom metabolizma i eliminacije iz organizma. Aminoglikozidi se slabo resorbuju iz gastrointestinalnog trakta pa je zato uobičajeno intramuskularno davanje leka. Maksimalna koncentracija leka u krvi se obično postiže za 30 – 120 minuta nakon injekcije. Njihova distribucija kroz organizam se uglavnom vrši preko ekstracelularnih tečnosti. Stepen njihovog vezivanja za proteine plazme je uglavnom manji od 10%. Najveća koncentracija se postiže u tkivu bubrega, naročito u korteksu dok je najniža koncentracija u očima i centralnom nervnom sistemu zbog visoke polarnosti molekula. Eliminacija aminoglikozidnih antibiotika se uglavnom vrši preko bubrega glomeluralnom filtracijom u nepromenjenom obliku. U proseku oko 80 – 90% leka se izlučuje preko urina dok se mali procenat izlučuje preko žuči. Uobičajeno vreme poluživota kod pacijenata sa normalnom renalnom funkcijom je oko 2 – 3 sata. Za određivanje adekvatnog farmakokinetičkog profila, neophodno je pratiti koncentraciju antibiotika u krvi, što zahteva kvantifikaciju iz biološkog materijala. U takvim slučajevima uticaj matriksa postaje od izuzetnog značaja. Iz tog razloga primena selektivnih i osetljivih

tehnika poput masene spektrometrije je od velikog značaja. (Kent R. Olson, 2004)(Williams D.A, 2008)

Poseban izazov u analitici ovakvih preparata predstavlja analiziranje doziranih oblika namenjenih za primenu u veterinarskoj medicini. Ovakvi preparati imaju drugačiji način aplikovanja pošto se u većini slučajeva ne sprovodi pojedinačna već grupna terapija na celoj populaciji životinja koje su u istim uslovima. Stoga se kod ovakvih preparata koriste kombinacije različitih aktivnih komponenti koje se u humanoj medicini obično ne bi primenjivale. Takođe, preparat se daje kako bolesnim životinjama sa ciljem tretmana infekcije, tako i zdvavim životinjama u njihovom okruženju u profilaktičke svrhe.(Williams D.A, 2008)

2.8 Metode određivanja aminoglikozidnih antibiotika

Ispitivanje sadržaja aminoglikozidnih aktivnih komponenti je do sada uglavnom vršeno primenom mikrobioloških metoda koje se ne mogu primeniti za određivanje prisustva degradacionih i srodnih supstanci u preparatu (Council of Europe, 2011.)(The Stationery Office, 2009) (United States Pharmacopoeial Convention., 2007). Zbog strukture aminoglikozidnih jedinjenja koja ne sadrže hromofoorne ili fluorofoorne grupe, ne mogu se primeniti ni uobičajene tehnike za ovaku vrstu ispitivanja - tečna hromatografija sa UV-Vis ili fluorescentnim detektorm. Stoga se ispitivanja vrše primenom amperometrijskih detektora koji su neselektivni i time otežavaju pojedinačno određivanje ispitivanih komponenti, pošto se na ovakovom tipu detektora dobija odgovor svih prisutnih komponenti koje uključuju i sve pomoćne materije u formulaciji. (Bin Guan, 2007), (Ghinami C., 2007), (Manyanga V. G. O., 2007), (Xi L. L., 2009) Na primer, prema zvaničnom propisu važeće Evropske i Britanske farmakopeje, kao i Američke farmakopeje (Council of Europe, 2011.)(Commission, 2010) (United States Pharmacopoeial Convention., 2007), određivanje sadržaja neomicina vrši primenom mikrobiološke metode, dok se srodne supstance neomicina, srodne supstance i sadržaj gentamicina kao i spektinomicina određuju primenom tečne hromatografije sa pulsnim amperometrijskim detektorm u kombinaciji sa postkolonskom derivatizacijom. U literaturi se mogu naći podaci o primeni različitih tehnika sa različitim načinima detekcije: npr. elektrohemijske, (Bin Guan, 2007), (Ghinami C., 2007), (Manyanga V. G. O., 2007), (Xi L. L., 2009), ELSD (Clarot I., 2004), (Clarot, 2005), (Megoulas, 2004), (N. Megoulas, 2004), (Wang J., 2006), ili metode kapilarne elektroforeze (Huidobro, 2009), (Srisom, 2007). Pritom, tehnike tečne hromatografije i kapilarne elektroforeze obično podrazumevaju primenu komplikovane predkolonske ili postkolonske derivatizacije. Na žalost, ovaj korak može značajno da utiče na reproduktivnost rezultata. (Al-Amoud A. I., 2002), (Al-Majed, 2008), (Gubernator J., 2006), (Kim B-H., 2003), (Krzek J., 2009), (Morovjain Gy., 1998), (Turnipseeda, 2009), (Yan H. D., 2009).

Imajući u vidu nedostatke pomenutih metoda, čini se da bi primena selektivnog detektora, poput masenog spektrometra, mogla da bude adekvatnije rešenje za ovakvu vrstu analize (Carretero V., 2008), (Grahek R., 2009), (Heller D.N., 2005), (Lecaroz C., 2006), (Li, 2007), (Loffler D., 2003), (Lopez M., 2008), (Oertel, 2004), (Peru K. M., 2006), (Sin D. W-M., 2004), (Tagiri-Endo M., 2009), (Turnipseeda, 2009), (W-M. Sin D., 2004), (W-X. Zhu, 2008), (Wang J., 2006), (Zhu, 2008). Kako analiza podrazumeva kvantifikaciju pojedinačnih komponenti koje su u većini slučajeva veoma slične strukture (vrlo često se radi o položajnim izomerima), neophodno je iskoristiti separacione mogućnosti tečne hromatografije u kombinaciji sa selektivnom detekcijom masenog spektrometra. Primena maseno-masene spektrometrije omogućava povećanje selektivnosti i osetljivosti metode koja treba da omogući detektovanje komponenti slične strukture, prisutnih u niskim koncentracijama.

U praksi su česte formulacije koje u sebi sadrže različite kombinacije antibiotika radi postizanja šireg spektra dejstva. Ovim se postiže kombinovanje različitih mehanizama dejstva različitih komponenti i veći učinak formulisanog leka. Međutim, ovo predstavlja dodatni problem u kvantifikaciji ovih jedinjenja zbog prisustva dodatnih komponenti koje se nalaze u formulaciji (uzorku), a time se otežava razvajanje i pojedinačna identifikacija ispitivanih komponenti.

Dakle, primena masene spektroskopije u analizi rešava probleme vezane za detekciju komponenti, kao i pitanje razdvajanja komponenti različitih masa. Primena maseno-masene spektrometrije bi omogućila detekciju svih komponenti, nezavisno od prisustva hromofora ili fluorofora u njihovoj strukturi i istovremeno razdvajanje komponenti zasnovano na razlici u njihovim masama čak i ako nije izvršeno njihovo hromatografsko razdvajanje. Primena tandem masene spektrometrije (triple quadrupole mass spectrometer – QQQ) omogućava povećenu selektivnost u detekciji komponenti i smanjenje uticaja matriksa. U selektivnom praćenju jona (multiple reaction monitoring – MRM) kroz prvi kvadropol se propuštaju samo joni određene mase čime se svi ostali joni koji potiču iz matriksa eliminišu. U drugom kvadropolu/oktopolu se vrši fragmentacija jona i dobijeni joni se selektivno propuštaju kroz treći kvadropol. Selekcijom jona koji prolaze kroz treći kvadropol vrši se eliminacija ometajućih produkata i dodatno se povećava selektivnost i osetljivost.

Imajući sve gore navedeno u vidu, za cilj ove disertacije postavljeno je razvijanje i validacija metoda za analizu aminoglikozidnih antibiotika i njihovih nečistoća u gotovim (komercijalnim) farmaceutskim formulacijama primenom tečne hromatografije kuplovane sa maseno-masenim detektorom. Odabранo je da se u tom smislu ispituju sledeće aktivne komponente iz grupe aminoglikozida: linkomicin, gentamicin, spektonomicin, neomicin, streptomicin, dihidrostreptomicin i oksitetraciklin iz grupe tetraciklina, kao primer kombinacije različitih grupa antibiotika u jednoj formulaciji. Metode koje će biti razvijene bi trebalo da omoguće identifikaciju i kvantifikaciju

ispitivanih komponenti i to, u poređenju sa do sada predloženim metodama, uz viši nivo selektivnosti i osetljivosti i skraćenje vremena analize.

3 Cilj rada

Cilj ove disertacije je bio:

1. Razvijanje i validacija metoda za analizu aminoglikozidnih antibiotika i njihovih nečistoća u farmaceutskim formulacijama koje se primenjuju u veterinarskoj medicini primenom tečne hromatografije kuplovane sa maseno-masenim detektorom. Odabrane ispitivane aktivne komponente iz grupe aminoglikozida su bile linkomicin, gentamicin, spektinomicin, neomicin, streptomycin, dihidrosteptomicin i oksitetraciklin iz grupe tetraciklina kao primer kombinacije različitih grupa antibiotika u jednoj formulaciji. Razvijene metode bi trebalo da omoguće identifikaciju i kvantifikaciju ispitivanih komponenti uz povećanje selektivnosti i skraćenje vremena analize.
2. Postavljenje parametara metode za analizu gentamicina i njegovih nečistoća uz kvantifikaciju svih 5 aktivnih komponenti pojedinačno – C1, C1a, C2, C2a i C2b. Sve ispitivane komponente (5 aktivnih komponenti, 5 nečistoća poznate strukture i 4 dodatne nečistoće) je potrebno identifikovati i kvantifikovati uz određivanje selektivnih MS/MS tranzicija sa što kraćim vremenom trajanja analize. Metodu je potrebno validirati za primenu u rutinskoj kontroli kvaliteta.
Prilagođavanje razvijene metode za analizu komercijalno dostupnih farmaceutskih doziranih oblika koji sadrže gentamicin ili smešu gentamicina i linkomicina kao aktivne komponente.
3. Postavljanje metode kojom se mogu analizirati linkomicin i spektinomicin i njihove nečistoće. Određivanje hromatografskih uslova za kompletno razdvajanje pojedinačnih komponenti (linkomicina kao aktivne komponente i njegove 4 strukturno okarakterisane i 1 nepoznate nečistoće i spektinomicina i njegovih 5 nečistoća). Potvrđivanje strukture svih komponenti uz pomoć MS/MS spektara. Validiranje metode za primenu u rutinskoj kontroli kvaliteta.
4. Analiziranje farmaceutskih doziranih oblika koji sadrže gentamicin i linkomicin ili linkomicin i spektinomicin kao aktivne komponente. Ispitivanjem ovih uzoraka potvrditi da nema međusobnih interferencija pri istovremenom ispitivanju ovih aktivnih komponenti i njihovih nečistoća i primenljivost metode u rutinskim ispitivanjima gotovih komercijalno dostupnih preparata.
5. Razvijanje metode za određivanje neomicina i njegovih nečistoća (1 aktivna komponenta i 7 nečistoća) sa što kraćim vremenom analize. Određivanje njihove specifične MS/MS tranzicije i potvrđivanje njihove identifikacije. Validiranje metode po važećoj ICH regulativi.

Utvrđivanje primenljivosti metode u analizi doziranih oblika za primenu u veterinarskoj medicini koji sadrže neomicin ili neomicin i oksitetraciklin kao aktivne principe. Ispitati da li ima uzajamnih smetnji pri analizi pojedinačnih komponenti iz uzoraka koji sadrže smešu dva antibiotika iz različitih grupa.

6. Postavljenje parametara metode za analizu streptomicina i njegovih nečistoća uz kvantifikaciju svih komponenti pojedinačno. Sve ispitivane komponente (1 aktivna komponenta i 4 nečistoće) je potrebno identifikovati i kvantifikovati uz određivanje selektivnih MS/MS tranzicija sa što kraćim vremenom trajanja analize. Metodu je potrebno validirati za primenu u rutinskoj kontroli kvaliteta.

Analiziranje farmaceutskih doziranih oblika koji sadrže streptomycin kao aktivnu komponentu i potvrditi primenljivost metode u rutinskim ispitivanjima gotovih komercijalno dostupnih preparata.

7. Razvijanje metode za određivanje dihidrostreptomicina i njegovih nečistoća (1 aktivna komponenta i 3 nečistoće) sa što kraćim vremenom analize. Određivanje njihove specifične MS/MS tranzicije i potvrđivanje njihove identifikacije. Validiranje metode po važećoj ICH regulativi.

Ispitivanje primenljivosti metode u analizi komercijalno dostupnih farmaceutskih doziranih oblika koji sadrže dihidrostreptomycin kao aktivnu komponentu.

8. Postavljanje parametara LC/MS/MS metode za analizu oksitetraciklina (aktivne komponente i 6 nečistoća) sa kraćim vremenom trajanja analize uz primenu mobilne faze jednostavnog sastava. Identifikovanje komponenti na osnovu selektivnih MS/MS tranzicija i validiranje metode u skladu sa ICH regulativama.

9. Primena razvijene metode u kontroli kvaliteta formulacija koje sadrže samo oksitetraciklin ili smešu oksitetraciklina i neomicina kao aktivnih komponenti. Ispitivanje uticaja matriksa i ostalih komponenti u preparatu na pojedinačno analiziranje svake od komponenti.

Ispitivanje primenljivosti razvijene metode u rutinskoj kontroli kvaliteta farmaceutskih formulacija, utvrđivanje njihove reproduktivnosti i pouzdanosti.

4 Eksperimentalni deo

4.1 Instrumentacija

Korišćen je tečni hromatografski Agilent Technologies HPLC sistem 1200 serije (Waldbonn, Nemačka), koji se sastoji od kvaternerne pumpe, vakuum degasera, termostatiranog autosamplera, termostatiranog odeljka za kolonu i diode array detektora (DAD). Hromatografsko razdvajanje je radjeno na Eclipse Plus C18 koloni (50 x 4,6 mm, veličina čestica 1,8 µm, Agilent Technologies, Waldbonn, Nemačka). Tečni hromatograf je bio povezan sa *triple quadrupole* masenim spektrometrom – QQQ Agilent Technologies 6410 serije (Santa Clara, USA) opremljenim multimode jonskim izvorom. Za potrebe detekcije aminoglikozidnih antibiotika, korišćena je elektrosprej ionizacija na atmosferskom pritisku (ESI) u pozitivnom modu ionizacije.

4.2 Uzorci

Postavljene metode su primenjene za ispitivanje gotovih komercijalno dostupnih farmaceutskih preparata namenjenih za primenu u veterinarskoj medicini, kao i za ispitivanje sirovina korišćenih za pripremu ovih doziranih oblika. Ispitivanje je sprovedeno na sirovinama gentamicin-sulfata, linkomicin-hidrohlorida, spektinimicin dihidrohlorida, neomicin-sulfata, streptomicin-sulfata, dihidrostreptomicin-sulfata i oksitetraciklin-hidrohlorida. Od gotovih farmaceutskih doziranih oblika, za ispitivanje su korišćeni sledeći preparati:

- ✓ Neogent® injekcije koje po deklaraciji sadrže 80 mg/mL gentamicin-sulfata
- ✓ Neolincogent® prašak koji po deklaraciji sadrži 10 mg gentamicin-sulfata i 360 mg linkomicin-hidrohlorida u 1 g praška
- ✓ Neoli-spec® injekcije koje sadrže 50 mg linkomicin-hidrohlorida i 100 mg spektinomicin-dihidrohlorida u 1 ml rastvora
- ✓ Neoli-spec P-44® prašak koji sadrži po deklaraciji 22 mg linkomicin-hidrohlorida i 22 mg spektinomicin-dihidrohlorida u 1 g praška
- ✓ Neomycin 25%® prašak koji sadrži 250 mg neomicin-sulfata u 1 g praška
- ✓ Neosulfox P® prašak koji sadrži 60 mg neomicin-sulfata i 40 mf oksitetraciklin-hidrohlorida u 1 g praška
- ✓ Neocyclin L.A.® injekcije koje po deklaraciji sadrže 200 mg oksitetraciklin-hidrohlorida u 1 ml rastvora
- ✓ Neostrep® injekcije koje sadrže 200.000 i.j. benzilpenicilin-prokain (prokain penicilina G) i 200 mg dihidrostreptomicina u 1 ml injekcije
- ✓ Neostrep L.A.® gde 1 ml suspenzije za injekciju sadrži: Prokain benzilpenicilina 120.000 i.j., benzatin benzilpenicilina 80.000 i.j. i dihidrostreptomicina (u obliku sulfata) 200 mg

- ✓ Streptomycin 20%[®] gde 1ml injekcionog rastvora sadrži streptomicina (u obliku sulfata) 200 mg
- ✓ Streptomycin P[®] koji po deklaraciji u 1 g oralnog praška sadrži 1 g streptomicin-sulfata

4.2.1 Parametri metode za određivanje gentamicina

Hromatografska metoda za analizu gentamicina podrazumeva gradijentno razdvajanje pojedinačnih aktivnih komponenti gentamicina koje su strukturno slične jedinjenja. Ovo razdvajanje se postiže na temperaturi od 32 °C, pri konstantnom protoku od 0,25 mL/min. Mobilna faza se sastoji od sledećih komponenti: mobilne faze A – 0,1 % (v/v) vodenog rastvora trifluorosircetne kiseline (sa dodatkom amonijaka do pH 2,5), mobilne faze B – 0,1 % (v/v) vodenog rastvora trifluorosircetne kiseline (sa dodatkom trietilamina do pH 2,5) i mobilne faze C – acetonitrila. Optimalni uslovi gradijenta su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Gradijentni uslovi hromatografske metode za analizu gentamicina

Vreme/min	Mobilna faza A	Mobilna faza B	Mobilna faza C
0	99,0%	1,0%	0,0%
14	94,5%	1,0%	4,5%
15	59,0%	1,0%	40,0%
18	59,0%	1,0%	40,0%
19	99,0%	1,0%	0,0%
30	99,0%	1,0%	0,0%

A - 0,1% (v/v) voden rastvor trifluorosircetne kiseline (sa dodatkom amonijaka do pH 2,5)

B - 0,1% (v/v) voden rastvor trifluorosircetne kiseline (sa dodatkom TEA do pH 2,5)

C - acetonitril

Injektovana je zapremina od 1 µl. Tečni hromatograf je bio povezan sa maseno-masenim spektrometrom opremljenim multimode jonskim izvorom. Korišćena je elektrosprej ionizacija pri atmosferskom pritisku u pozitivnom modu uz temperaturu gasa od 325 °C i temperaturu isparivača od 200 °C. Azot je korišćen kao gas za sušenje, pri protoku od 5 L/min, i kao gas raspršivač pri pritisku od 60 psi. Na kapilaru je primenjen napon od 2000 V, vreme MRM-a je bilo 200 ms, napon fragmentacije je bio 70 V dok je korišćena koliziona energija od 10 V.

4.2.1.1 Reagensi

Standard gentamicin-sulfata je proizveden od strane European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM). Acetonitril (HPLC stepena čistoće), 25% voden rastvor amonijaka, trietilamin (TEA) i trifluorosirćetna kiselina (TFA) su nabavljeni od JT Baker (Breda, Holandija). Ultračista voda je donijena iz Milli-Q sistema proizvedenog od strane Millipore (Bedford, MA, USA). Komercijalni uzorci koji sadrže gentamicin-sulfat su proizvedeni i nabavljeni od FMPharm (Subotica, Serbia). Metoda je ispitivana na sledećim komercijalno dostupnim formulacijama: Neogent® injekcijama koje sadrže 80 mg gentamicin-sulfata u 1 mL uzorka i Neolincogent® prašku koji sadrži 360 mg linkomicin-hidrohlorida i 10 mg gentamicin-sulfata u 1 g praška.

4.2.1.2 Priprema standardnih rastvora

Standardni rastvor gentamicin-sulfata je pripremljen rastvaranjem standarda u vodi, kako bi se dobio rastvor početne koncentracije od 500 µg/mL. Rastvori standarda za ispitivanje linearnosti metode i kreiranje kalibracione krive su dobijeni razblaživanjem stok rastvora vodom kako bi se dobole adekvatne koncentracije (25 – 500 µg/mL).

4.2.1.3 Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode

Tri serije rastvora koji sadrže 25, 100 i 500 µg/mL gentamicin-sulfata u vodi, sa po šest rastvora standarda u svakoj seriji, pripremljeni su i injektovani za ispitivanje preciznosti metode.

4.2.1.4 Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode

Laboratorijske smeše koje sadrže placebo komponente i aktivne supstance (gentamicin-sulfat ili gentamicin-sulfata i linkomicin-hidrohlorid) su pripremljene u vodi u adekvatnim koncentracijama koje odgovaraju ispitivanim formulacijama. Laboratorijske smeše su tretirane na isti način kao ispitivane formulacije koje su korištene za pripremu rastvora uzorka. Za kvantitativnu analizu laboratorijskih smeša, pripremljene su po tri serije razblaženja, od po šest rastvora u svakoj seriji, u koncentracijama koje odgovaraju 80, 100 i 120% odgovarajućih koncentracija ispitivanih formulacija.

4.2.1.5 Priprema ispitivanih rastvora

Rastvor uzorka sirovine gentamicin-sulfata je dobijen rastvaranjem uzorka u vodi do koncentracije od 100 µg/mL ukupnih gentamicina.

Rastvor uzorka Neogent® injekcija, koje sadrže 80 mg/mL gentamicin-sulfata, pripremljen je razblaživanjem uzorka vodom do radne koncentracije od 100 µg/mL ukupnih gentamicina.

Rastvor uzorka Neolincogent[®], formulacije koja sadrži 10 mg gentamicin-sulfata i 360 mg linkomicin-hidrohlorida u 1 g praška, pripremljen je rastvaranjem uzorka u vodi kako bi se dobili rastvori sa finalnom koncentracijom od 100 µg/mL gentamicin-sulfata.

4.2.2 Parametri metode za određivanje linkomicina

Metoda za analizu linkomicina obuhvatala je uslove koji podrazumevaju izokratsku metodu sa mobilnom fazom koja se sastoji od smeše vodenog rastvora trifluorosirćetne kiseline (0,05%, v/v, pH 3,0, podešeno amonijakom) i acetonitrila i odnosu 90%:10% (v/v) pri ukupnom protoku od 0,5 mL/min. Injektovana je zapremina od 1 µL. Parametri masenog detektora su obuhvatili primenu ESI ionizacije u pozitivnom modu pri temperaturi gasa od 325 °C, temperaturu isparivača od 200 °C. Azot je korišćen kao gas za sušenje pri protoku od 5 L/min i kao gas raspršivač pri pritisku od 60 psi. Na kapilaru je primenjivan napon od 2000 V, vreme MRM-a je bilo 200 ms, napon fragmentacije je bio 70 V, dok je korišćena koliziona energija od 10 V.

4.2.2.1 Reagensi

Standard linkomicin-hidrohlorida je proizveden od strane European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM). Acetonitril (HPLC stepena čistoće), 25% voden rastvor amonijaka i trifluorosirćetna kiselina (TFA) su nabavljeni od JT Baker (Breda, Holandija). Ultračista voda je dobijena iz Milli-Q sistema proizvedenog od strane Millipore (Bedford, MA, USA). Komercijalni uzorci koji sadrže gentamicin-sulfat su proizvedeni i nabavljeni od FMPHarm (Subotica, Serbia). Metoda je ispitivana na sledećim komercijalno dostupnim formulacijama: Neolincogent[®] prašku koji sadrži 360 mg linkomicin-hidrohlorida i 10 mg gentamicin-sulfata u 1 g praška, Neoli-spec[®] injekcijama koje sadrže 50 mg linkomicin-hidrohlorida i 100 mg spektinomicin-dihidrohlorida u 1 mL rastvora i Neoli-spec P-44[®] prašak koji sadrži 22 mg linkomicin-hidrohlorida i 22 mg spektinomicin-dihidrohlorida u 1 g praška.

4.2.2.2 Priprema standardnih rastvora

Rastvori standarda linkomicin-hidrohlorida su pripremljeni rastvaranjem standarda linkomicin-hidrohlorida u vodi i dobijanjem rastvora koncentracije 500 µg/mL, koji je potom razblaživan vodom do odgovarajućih koncentracija u rasponu 10 – 100 µg/mL, koji su korišćeni za konstruisanje kalibracione krive.

4.2.2.3 Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode

Za ispitivanje preciznosti metode, pripremljene su po tri serije od po šest rastvora koji sadrže 10, 50 i 100 µg/mL linkomicin-hidrohlorida razblaživanjem adekvatnih stok rastvora koncentracije 500 µg/mL.

4.2.2.4 Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode

Laboratorijske smeše koje sadrže placebo komponente i aktivne supstance (gentamicin-sulfata i linkomicin-hidrohlorid ili linkomicin-hidrohlorid i spektinomicin-dihidrohlorid) su pripremljene u vodi, u koncentracijama koje odgovaraju ispitivanim formulacijama. Laboratorijske smeše su tretirane na isti način kao ispitivane formulacije koje su korišćene za pripremu rastovora uzoraka. Za kvantitativnu analizu laboratorijskih smeša, pripremljene su po tri serije razblaženja, od po šest rastvora u svakoj seriji, u koncentracijama koje odgovaraju 80, 100 i 120% odgovarajućih koncentracija ispitivanih formulacija.

4.2.2.5 Priprema ispitivanih rastvora

Rastvor uzorka ispitivane sirovine linkomicin-hidrohlorida je pripremljen rastvaranjem sirovine u vodi do koncentracije od 50 µg/mL linkomicin-hidrohlorida.

Rastvor uzorka Neolincogent®, formulacije koja sadrži 10 mg gentamicin-sulfata i 360 mg linkomicin-hidrohlorida u 1 g praška, pripremljen je rastvaranjem uzorka u vodi kako bi se dobili rastvori sa finalnom koncentracijom od 50 µg/mL linkomicin-hidrohlorida.

Rastvor uzorka Neoli-spec® injekcija, koje sadrže 50 mg linkomicin-hidrohlorida i 100 mg spektinomicin-dihidrohlorida u 1 mL, pripremljen je razblaživanjem uzorka vodom kako bi se dobili zasebni rastvori koji sadrže po 50 µg/mL aktivne komponente.

Rastvori uzorka Neoli-spec P-44® praška, koji sadrži 22 mg linkomicin-hidrohlorida i 22 mg spektinomicin-dihidrohlorida u 1 g praška, pripremljeni su rastvaranjem uzorka u odgovarajućoj količini kako bi se dobio rastvor koji sadrži po 50 µg/mL linkomicin-hidrohlorida i spektinomicin-dihidrohlorida.

4.2.3 Parametri metode za određivanje spektinomicina

Metoda za analizu spektinomicina podrazumeva izokratsku metodu sa mobilnom fazom koja se sastoji od smeše vodenog rastvora trifluorosirčetne kiseline (0,05%, v/v, pH 3,0, podešeno amonijakom) i acetonitrila i odnosu 90%:10% (v/v) pri ukupnom protoku od 0,5 mL/min. Zapremina injektovanja je bila 1 µl. Parametri masenog detektora su obuhvatili primenu ESI ionizacije u pozitivnom modu pri temperaturi gasa od 325 °C, temperaturu isparivača od 200 °C. Azot je korišćen kao gas za sušenje pri protoku od 5 L/min i kao gas raspršivač pri pritisku od 60 psi. Na kapilaru je primenjivan napon od 2000 V, vreme MRM-a je bilo 200 ms, napon fragmentacije je bio 80 V, dok je korišćena koliziona energija od 24 V.

4.2.3.1 Reagensi

Standard spektinomicin-dihidrohlorida je proizведен od strane European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM). Acetonitril (HPLC stepena čistoće), 25% voden rastvor amonijaka i trifluorosirćetna kiselina (TFA) su nabavljeni od JT Baker (Breda, Holandija). Ultračista voda je dobijena iz Milli-Q sistema proizvedenog od strane Millipore (Bedford, MA, USA). Komercijalni uzorci koji sadrže gentamicin-sulfat su proizvedeni i nabavljeni od FMPharm (Subotica, Serbia). Metoda je ispitivana na sledećim komercijalno dostupnim formulacijama: Neoli-spec® injekcijama koje sadrže 50 mg linkomicin-hidrohlorida i 100 mg spektinomicin-dihidrohlorida u 1 mL rastvora i Neoli-spec P-44® prašak koji sadrži 22 mg linkomicin-hidrohlorida i 22 mg spektinomicin-dihidrohlorida u 1 g praška.

4.2.3.2 Priprema rastvora standarda

Rastvori standarda spektinomicin-dihidrohlorida su pripremljeni na isti način kao kod linkomicin-hidrohlorida – razblaživanjem vodenog stok rastvora koncentracije 500 µg/mL do rastvora koncentracija 10 – 100 µg/mL.

4.2.3.3 Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode

Za ispitivanje preciznosti metode, pripremljene su po tri serije od po šest rastvora koji sadrže 10, 50 i 100 µg/mL spektinomicin-dihidrohlorida razblaživanjem adekvatnih stok rastvora koncentracije 500 µg/mL.

4.2.3.4 Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode

Laboratorijske smeše koje sadrže placebo komponente i aktivne supstance (linkomicin-hidrohlorid i spektinomicin-dihidrohlorid) su bile pripremljene u vodi u koncentracijama koje odgovaraju koncentracijama ispitivanih formulacija. Laboratorijske smeše su tretirane na isti način kao ispitivane formulacije koje su korištene za pripremu rastovora uzorka. Za kvantitativnu analizu laboratorijskih smeša, pripremljene su po tri serije razblaženja, od po šest rastvora u svakoj seriji, u koncentracijama koje odgovaraju 80, 100 i 120% odgovarajućih koncentracija ispitivanih formulacija.

4.2.3.5 Priprema ispitivanih rastvora

Rastvor uzorka ispitivane sirovine spektinomicin-dihidrohlorida je pripremljen rastvaranjem uzorka u vodi do radne koncentracije od 50 µg/mL.

Rastvor uzorka Neoli-spec® injekcija, koje sadrže 50 mg linkomicin-hidrohlorida i 100 mg spektinomicin-dihidrohlorida u 1 mL, pripremljen je razblaživanjem uzorka vodom kako bi se dobili zasebni rastvori koji sadrže po 50 µg/mL aktivne komponente.

Rastvori uzorka Neoli-spec P-44® praška, koji sadrži 22 mg linkomicin-hidrohlorida i 22 mg spektinomicin-dihidrohlorida u 1 g praška, pripremljeni su rastvaranjem uzorka u odgovarajućoj količini kako bi se dobio rastvor koji sadrži po 50 µg/mL linkomicin-hidrohlorida i spektinomicin-dihidrohlorida.

4.2.4 Parametri metode za određivanje neomicina

Hromatografsko razdvajanje je postignuto pri temperaturi od 20 °C primenom mobilne faze koja se sastoji od smeše mobilne faze A – 0,1% rastvora heptafluorobuterne kiseline (HFBA) u vodi sa dodatkom amonijaka do pH 2,5 i mobilne faze B – acetonitrila. Mobilne faze su korišćene u gradijentnom odnosu prikazanom u Tabeli 3 pri ukupnom protoku od 0,5 mL/min. Zapremina injektovanja je 1 µl.

Tabela 3. Gradijentni uslovi hromatografske metode za analizu neomicina

Vreme	Mobilna faza A	Mobilna faza B
0 min	95,0%	5,0%
12 min	50,0%	50,0%
18 min	30,0%	70,0%
22 min	30,0%	70,0%

* A – 0,1% rastvor heptafluorobuterne kiseline (HFBA) u vodi sa dodatkom amonijaka do pH 2,5
B - acetonitril

Parametri masenog detektora su obuhvatili primenu ESI ionizacije u pozitivnom modu pri temperaturi gasa od 325 °C, temperaturu isparivača od 225 °C. Azot je korišćen kao gas za sušenje pri protoku od 6 L/min i kao gas raspršivač pri pritisku od 60 psi. Na kapilaru je primenjen napon od 2500 V, vreme MRM-a je bilo 10 ms, napon fragmentacije je bio 150 V, dok je korišćena koliziona energija od 43 V.

4.2.4.1 Reagensi

Standard neomicin-sulfata je nabavljen od European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM) (Strasbourg, Francuska). Acetonitril (HPLC stepena čistoće), 25% voden rastvor amonijaka, trietilamin (TEA) i trifluorosirčetna kiselina (TFA) su nabavljeni od JT Baker (Breda, Holandija). Ultračista voda je dobijena iz Milli-Q sistema proizvedenog od strane Millipore (Bedford, MA, USA). Komercijalni uzorci koji sadrže neomicin-sulfat su proizvedeni i nabavljeni od FMPPharm (Subotica, Srbija). Metoda je ispitivana na sledećim komercijalno dostupnim formulacijama: Neomycin 25%® prašku koji sadrži 250 mg neomicin-sulfata u 1 g praška i Neosulfox P® prašku koji sadrži 60 mg neomicin-sulfata i 40 mg oksitetraciklin-hidrohlorida u 1 g praška.

4.2.4.2 Priprema rastvora standarda

Stok rastvor neomicin-sulfata u koncentraciji od 500 µg/mL je pripremljen rastvaranjem standardne supstance u vodi. Rastvori za ispitivanje linearnosti metode i kreiranje kalibracione krive su pripremljeni razblaživanjem stok rastvora vodom do odgovarajućih koncentracija 10 – 120 µg/mL.

4.2.4.3 Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode

Tri serije vodenih rastvora koje sadrže po 10, 50 and 120 µg/mL neomicina, od po šest rastvora u svakoj seriji, pripremljene su i injektovanje za ispitivanje preciznosti metode.

4.2.4.4 Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode

Laboratorijske smeše koje sadrže placebo komponente i aktivne supstance (neomicin-sulfata ili neomicin-sulfata i oksitetraciklin-hidrohlorida) su pripremljene u vodi u adekvatnim koncentracijama koje odgovaraju ispitivanim formulacijama. Laboratorijske smeše su tretirane na isti način kao ispitivane formulacije koje su korišćene za pripremu rastovora uzorka. Za kvantitativnu analizu laboratorijskih smeša, pripremljene su po tri serije razblaženja, od po šest rastvora u svakoj seriji, u koncentracijama koje odgovaraju 80, 100 i 120% odgovarajućih koncentracija ispitivanih formulacija.

4.2.4.5 Priprema ispitivanih rastvora

Priprema ispitivanog rastvora Neomycin 25%, koji sadrži 250 mg neomicin-sulfata u 1 g praška, podrazumeva rastvaranje uzorka u vodi do radne koncentracije od 50 µg /mL.

Rastvor za ispitivanje Neosulfox P®, formulacije koja sadrži 60 mg neomicin-sulfata i 40 mg oksitetraciklin-hidrohlorida u 1 g praška, pripremljen je rastvaranjem uzorka u vodi do koncentracije od 50 µg /mL mg neomicin-sulfata i 50 µg /mL oksitetraciklin-hidrohlorida.

4.2.5 Parametri metode za određivanje streptomicina

Hromatografsko razdvajanje streptomicina i njegovih nečistoća je postignuto na temperaturi od 20 °C primenom gradijenta mobilne faze koja se sastoji od mobilne faze A – 0,1 % vodenog rastvora heptafluorobuterne kiseline, pH 2,5 i mobilne faze B – acetonitrila. Gradijent je prikazan u Tabeli 4. Injektoran je zapremina od 1 µL.

Tabela 4 Gradijentni uslovi hromatografske metode za analizu streptomicina

Vreme	Mobilna faza A	Mobilna faza B
0 min	95,0%	5,0%
15 min	50,0%	50,0%

A – 0,1% rastvor heptafluorobuterne kiseline (HFBA) u vodi sa dodatkom amonijaka do pH 2,5
B - acetonitril

Parametri masenog detektora koji je povezan sa tečnim hromatografom bili su sledeći: korišćena je ESI ionizacija u pozitivnom modu uz temperaturu gasa od 250 °C i temperaturu isparivača od 200 °C. Azot je korišćen kao gas za sušenje pri protoku od 5 L/min i kao gas raspršivač pri pritisku od 60 psi. Na kapilaru je primenjen napon od 2000 V, vreme MRM-a je bilo 50 ms, napon fragmentacije je bio 120 V dok je korišćena koliziona energija od 40 V.

4.2.5.1 Reagensi

Streptomycin-sulfat je nabavljen od European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM) (Strasbourg, Francuska). Acetonitril (HPLC stepena čistoće), 25% voden rastvor amonijaka, heptafluorobuterna kiselina (HFBA) su nabavljeni od JT Baker (Breda, Holandija). Ultračista voda je donijena iz Milli-Q sistema proizvedenog od strane Millipore (Bedford, MA, USA). Metoda je ispitivana na sirovinama streptomycin-sulfata.

4.2.5.2 Priprema rastvora standarda

Stok rastvor streptomycin-sulfata u koncentraciji od 500 µg/mL je pripremljen rastvaranjem standardne supstance u vodi. Rastvori za ispitivanje linearnosti metode i kreiranje kalibracione krive su pripremljeni razblaživanjem stok rastvora vodom do odgovarajućih koncentracija 10 – 120 µg/mL.

4.2.5.3 Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode

Tri serije vodenih rastvora koje sadrže po 10, 50 and 120 µg/mL streptomycin-sulfata, od po šest rastvora u svakoj seriji, pripremljene su i injektovane za ispitivanje preciznosti metode.

4.2.5.4 Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode

Rastvori sirovine streptomycin-sulfata sa dodatkom tačno definisane količine standarda su pripremljene u vodi, u koncentracijama koje odgovaraju 80, 100 i 120% radne koncentracije. Za kvantitativnu analizu, pripremljene su po tri serije razblaženja, od po šest rastvora u svakoj seriji i injektovane.

4.2.5.5 Priprema ispitivanih rastvora

Rastvor ispitivane sirovine u vodi je napravljen u radnoj koncentraciji od 50 µg /mL mg streptomycin-sulfata i injektovan. Rastvor uzorka Streptomycin 20%[®] gde 1ml injekcionog rastvora sadrži streptomicina (u obliku sulfata) 200 mg je pripremljen razblaživanjem injekcionog rastvora do radne koncentracije od 50 µg /mL mg streptomycin-sulfata.

4.2.6 Parametri metode za određivanje dihidrostreptomicina

Hromatografsko razdvajanje dihidrostreptomicina i njegovih nečistoća je postignuto na temperaturi od 20 °C primenom gradijenta mobilne faze koja se sastoji od mobilne faze A – 0,1 % vodenog rastvora heptafluorobuterne kiseline, pH 2,5 i mobilne faze B – acetonitrila. Gradijent je prikazan u Tabeli 5. Injektovanja je zapremina od 1 µL.

Tabela 5. Gradijentni uslovi hromatografske metode za analizu streptomicina

Vreme	Mobilna faza A	Mobilna faza B
0 min	85,0%	15,0%
8 min	30,0%	70,0%
9 min	30,0%	70,0%

A – 0,1% rastvor heptafluorobuterne kiseline (HFBA) u vodi sa dodatkom amonijaka do pH 2,5
B - acetonitril

Parametri masenog detektora koji je povezan sa tečnim hromatografom su sledeći: korišćena je ESI ionizacija u pozitivnom modu uz temperaturu gasa od 250 °C i temperaturu isparivača od 200 °C. Azot je korišćen kao gas za sušenje pri protoku od 5 L/min i kao gas raspršivač pri pritisku od 60 psi. Na kapilaru je primenjen napon od 2000 V, vreme MRM-a je bilo 150 ms, napon fragmentacije je bio 140 V dok je korišćena koliziona energija od 30 V.

4.2.6.1 Reagensi

Dihidrostreptomicin-sulfat je nabavljen od European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM) (Strasbourg, Francuska). Acetonitril (HPLC stepena čistoće), 25% voden rastvor amonijaka, heptafluorobuterna kiselina (HFBA) su nabavljeni od JT Baker (Breda, Holandija). Ultračista voda je donijena iz Milli-Q sistema proizvedenog od strane Millipore (Bedford, MA, USA). Metoda je ispitivana na sirovinama dihidrostreptomicin-sulfata.

4.2.6.2 Priprema rastvora standarda

Stok rastvor dihidrostreptomicin-sulfata u koncentraciji od 500 µg/mL je pripremljen rastvaranjem standardne supstance u vodi. Rastvori za ispitivanje linearnosti metode i kreiranje kalibracione krive su pripremljeni razblaživanjem stok rastvora vodom do odgovarajućih koncentracija 10 – 120 µg/mL.

4.2.6.3 Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode

Tri serije vodenih rastvora koje sadrže po 10, 50 and 120 µg/mL dihidrostreptomicin-sulfata, od po šest rastvora u svakoj seriji, pripremljene su i injektovanje za ispitivanje preciznosti metode.

4.2.6.4 Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode

Rastvori sirovine dihidrostreptomicin-sulfata sa dodatkom tačno definisane količine standarda su pripremljene u vodi u koncentracijama koje odgovaraju 80, 100 i 120% radne koncentracije. Za kvantitativnu analizu, pripremljene su po tri serije razblaženja, od po šest rastvora u svakoj seriji i injektovane.

4.2.6.5 Priprema ispitivanih rastvora

Rastvor ispitivane sirovine u vodi je napravljen u radnoj koncentraciji od 50 µg /mL mg dihidrostreptomicin-sulfata i injektovan. Rastvori uzorka Neostrep® injekcije koje sadrže 200.000 i.j. benzilpenicilin-prokaina (prokain penicilina G) i 200 mg dihidrostreptomicina u 1 ml injekcije je pripremljen razblaživanjem vodom do radne koncentracije od 50 µg /mL mg dihidrostreptomicin-sulfata, kao i rastvor Neostrep L.A.® gde 1 ml suspenzije za injekciju sadrži prokain benzilpenicilina 120.000 i.j., benzatin benzilpenicilina 80.000 i.j. i dihidrostreptomicina (u obliku sulfata) 200 mg.

4.2.7 Parametri metode za određivanje oksitetraciklina

Hromatografsko razdvajanje oksitetraciklina i njegovih nečistoća i srodnih supstanci je dobijeno na temperaturi od 50 °C primenom gradijenta mobilne faze koja se sastoji od mobilne faze A – 0,3 % vodenog rastvora trifluorosirčetne kiseline pH 2,5 podešeno dodatkom amonijaka i mobilne faze B – metanola. Gradijent je prikazan u Tabeli 6. Zapremina injektovanja je 10 µL.

Tabela 6. Gradijentni uslovi hromatografske metode za analizu oksitetraciklina

Vreme	Mobilna faza A	Mobilna faza B
0 min	93,0%	7,0%
2 min	93,0%	7,0%
14 min	31,0%	69,0%
17 min	0,0%	100,0%
18 min	0,0%	100,0%

A – 0,3% rastvor trifluorosirčetne kiseline (TFA) u vodi sa dodatkom amonijaka do pH 2,5

B – metanol

Parametri masenog detektora koji je povezan sa tečnim hromatografom bili su sledeći: korišćena je ESI ionizacija u pozitivnom modu uz temperaturu gasa od 325 °C i temperaturu isparivača od 225 °C. Azot je korišćen kao gas za sušenje pri protoku od 6 L/min i kao gas raspršivač pri pritisku od 60 psi. Na kapilaru je primenjen napon od 2500 V, vreme MRM-a je bilo 10 ms, napon fragmentacije je bio 110 V dok je korišćena koliziona energija od 20 V.

4.2.7.1 Reagensi

Standard oksitetraciklin-hidrohlorida je nabavljen od European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM) (Strasbourg, Francuska). Acetonitril (HPLC stepena čistoće), 25% voden rastvor amonijaka, trietilamin (TEA) i trifluorosirćetna kiselina (TFA) su nabavljeni od JT Baker (Breda, Holandija). Ultračista voda je dobijena iz Milli-Q sistema proizvedenog od strane Millipore (Bedford, MA, USA). Komercijalni uzorci koji sadrže oksitetraciklin-hidrohlorid su proizvedeni i nabavljeni od FMPharm (Subotica, Srbija). Metoda je ispitivana na sledećim komercijalno dostupnim formulacijama: Neosulfox P® prašku koji sadrži 60 mg neomicin-sulfata i 40 mg oksitetraciklin-hidrohlorida u 1 g praška i Neocyclin L.A.®, injekcijama koje sadrže 200 mg oksitetraciklin-hidrohlorida u 1 ml formulacije.

4.2.7.2 Priprema rastvora standarda

Stok rastvor oksitetraciklin-hidrohlorida u koncentraciji od 500 µg/mL je pripremljen rastvaranjem standardne supstance u vodi. Rastvori za ispitivanje linearnosti metode i kreiranje kalibracione krive su pripremljeni razblaživanjem stok rastvora vodom do odgovarajućih koncentracija 10 – 120 µg/mL.

4.2.7.3 Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode

Tri serije vodenih rastvora koje sadrže po 10, 50 and 120 µg/mL oksitetraciklin-hidrohlorida, od po šest rastvora u svakoj seriji, pripremljene su i injektovanje za ispitivanje preciznosti metode.

4.2.7.4 Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode

Laboratorijske smeše koje sadrže placebo komponente i aktivne supstance (oksitetraciklin-hidrohlorida ili neomicin-sulfata i oksitetraciklin-hidrohlorida) su pripremljene u vodi u adekvatnim koncentracijama koje odgovaraju ispitivanim formulacijama. Laboratorijske smeše su tretirane na isti način kao ispitivane formulacije koje su korišćene za pripremu rastovora uzorka. Za kvantitativnu analizu laboratorijskih smeša, pripremljene su po tri serije razblaženja, od po šest rastvora u svakoj seriji, u koncentracijama koje odgovaraju 80, 100 i 120% odgovarajućih koncentracija ispitivanih formulacija.

4.2.7.5 Priprema ispitivanih rastvora

Rastvor za ispitivanje sirovine oksitetraciklin-hidrohlorida je pripremljen rastvaranjem sirovine u vodi do radne koncentracije od 50 µg /mL.

Rastvor za ispitivanje Neosulfox P®, formulacije koja sadrži 60 mg neomicin-sulfata i 40 mg oksitetraciklin-hidrohlorida u 1 g praška, pripremljen je rastvaranjem uzorka u vodi do koncentracije od 50 µg /mL mg neomicin-sulfata i 50 µg /mL oksitetraciklin-hidrohlorida.

Rastvor za ispitivanje Neocyclin L.A.® injekcija, koje sadrže 200 mg oksitetraciklin-hidrohlorida u 1 ml formulacije, pripremljen je razblaživanjem injekcije do koncentracije od 50 µg/mL oksitetraciklin-hidrohlorida.

5 Rezultati i diskusija

Farmaceutski dozirani oblici, koji sadrže aminoglikozidne antibiotike kao aktivne komponente, redovno se ispituju kako na prisustvo nečistoća, tako i na sadržaj aktivne komponente. Farmakopeje definišu brojne metode tečne i gasne hromatografije, kao i mikrobiološke metode za njihovo određivanje (4, 6, 11) (Council of Europe, 2011.)(Commission, 2010)(United States Pharmacopoeial Convention., 2007). Gentamicin je kompleks aminoglikozida koji se uglavnom sastoji od smeše gentamicina C1, C1a, C2, C2a i C2b (Slika 10). Rutinski, u farmaceutskoj industriji, zbog višekomponentne prirode gentamicina, određuje se samo relativni procenat glavnih komponenti. Za određivanje sastava gentamicina i spektinomicina, Evropska farmakopeja propisuje metodu reverzno fazne tečne hromatografije sa elektrohemijском detekcijom nakon postkolonske derivatizacije. Linkomicin se ispituje na prisustvo linkomicina B kao glavne nečistoće. Takođe se koriste mikrobiološka određivanja, imunoodređivanja i ELISA metode koje ne mogu kvantifikovati pojedinačne komponente gentamicina kao ni nečistoće prisutne u doziranim oblicima.

Kao što je već pomenuto, analiza aminoglikozida predstavlja izazov zbog nedostatka značajnih hromofora ili fluorofora u ovim strukturama. Brojne analitičke metode su korištene za kvantifikaciju aminoglikozida u literaturi. Sa ovim ciljem primenjivane su različite tehnike poput tečne hromatografije sa UV detekcijom i derivatizacijom (Kim B-H., 2003), (Kühn K. D., 2008), (Yan H. D., 2009), tečna hromatografija sa fluorescentnom detekcijom i derivatizacijom (Morovjain Gy., 1998), (Al-Majed, 2008), (Al-Amoud A. I., 2002), tečna hromatografija sa elektrohemijском detekcijom (Ghinami C., 2007),(Manyanga V. K. K., 2008), (Manyanga V. G. O., 2007), (Bin Guan, 2007), (Zawilla N.H., 2006), (Pendela M., 2004), (Xi L. L., 2009), tečna hromatografija sa detekcijom pomoću evaporative light scattering detektora (Clarot, 2005), (Megoulas, 2004), (Wang M-J., 2006), ili kapilarna elektroforeza (Yuan L. L., 2005), (Srisom, 2007), (Huidobro, 2009). Korištene metode tečne hromatografije i kapilarne elektroforeze su zahtevale kao neophodni korak predkolonsku ili postkolonsku derivatizaciju (poput derivatizacije sa o-ftalaldehidom (OPA)/merkaptosirćetnom kiselinom (MAA)), kako bi se omogućila UV ili fluorescentna detekcija. Iako je ovakav način detekcije prilično osetljiv, obavezni korak derivatizacije zahteva vreme uz neophodne dobro kontrolisane eksperimentalne uslove za dobijanje reproduktivnih rezultata. Uzimajući ovo u obzir, masena spektrometrija predstavlja metodu izbora za detekciju aminoglikozida, pošto omogućava visok stepen osetljivosti i pouzdanu identifikaciju bez derivatizacionih koraka. Ovakav način detekcije je korišćen u mnogim studijama koje su za predmet istraživanja imale različite vrste uzoraka i ciljeve (Loffler D., 2003), (Zhu, 2008), (Heller D.N., 2005), (Lecaroz C., 2006), (Grahek R., 2009), (Li B., 2011), (Sin D. W-M., 2004), (Lopez M., 2008), (Carretero V., 2008), (Sin D. W-M., 2004), (Oertel, 2004), (Turnipseeda, 2009), (Li, 2007).

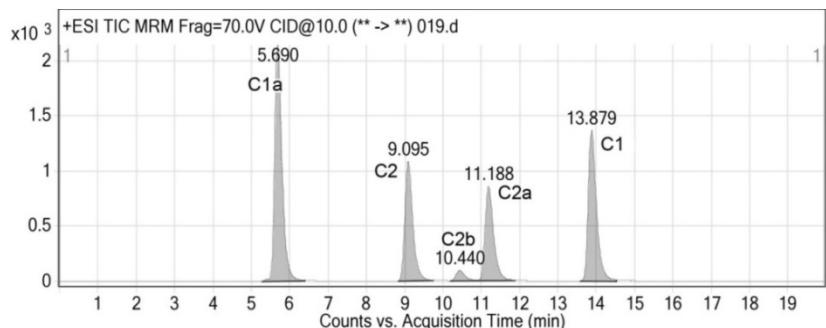
Podstaknuti ispred pomenutim, i imajući na umu da se izazovi i problemi vezani za analiziranje aminoglikozidnih antibiotika veoma razlikuju u zavisnosti od aktivne supstance, za cilj ove disertacije postavljeno je ispitivanje sledećih antibiotika: gentamicina, linkomicina, spektinomicina, neomicina, streptomicina i dihidrostreptomicina. Pored metoda za ispitivanje aminoglikozida, urađen je razvoj i validacija metode za analizu oksitetraciklin-hidrochlora zbog prisustva ove aktivne komponente u formulaciji koja sadrži kombinaciju aminoglikozida i tetraciklina (preparati sa ovakvom kombinacijom antibiotika omogućavaju širi spektar dejstva). Ispitivanje je potvrđilo mogućnost analize pojedinačnih komponenti i njihovih nečistoća i srodnih supstanci nesmetano od prisustva drugih komponenti.

5.1 Određivanje gentamicin-sulfata

Glavni izazov u razvoju LC/MS/MS metode za analizu gentamicin-sulfata je bilo postizanje kompletног hromatografskog razdvajanja C2 komponenti gentamicina. Kako ispitivani gentamicin-sulfat predstavlja smešu aktivnih komponenti – C1, C1a, C2, C2a i C2b (Slika 10) i pošto su ispitivane C2 komponente položajni i/ili stereoizomeri koji imaju istu molekulsku masu (time i jone istih m/z vrednosti), bilo je neophodno postići njihovo hromatografsko razdvajanje. Optimizacija hromatografskih uslova uključivala je korišćenje različitih pufera sa različitim pH vrednostima, različitih uslova gradijenta kao i testiranje različitih stacionarnih faza. Prisustvo trietilamina (TEA) u puferima rezultira boljim oblicima pikova i kraćim retencionim vremenima ali pod takvim uslovima C2 komponente nisu mogle biti kompletно odvojene od ostalih aktivnih komponenti smeše. Takođe, površine odgovora ispitivanih MS/MS tranzicija su bile veoma male, pošto TEA utiče na ionizaciju. Stoga, kompromis između oblika pikova i osetljivosti sa jedne strane i rezolucije sa druge strane, postignut je korišćenjem pufera koji sadrži 0,1% TFA sa amonijakom i samo 1,0% pufera koji sadrži 0,1% TFA sa TEA za poboljšanje rezolucije i oblika pikova.

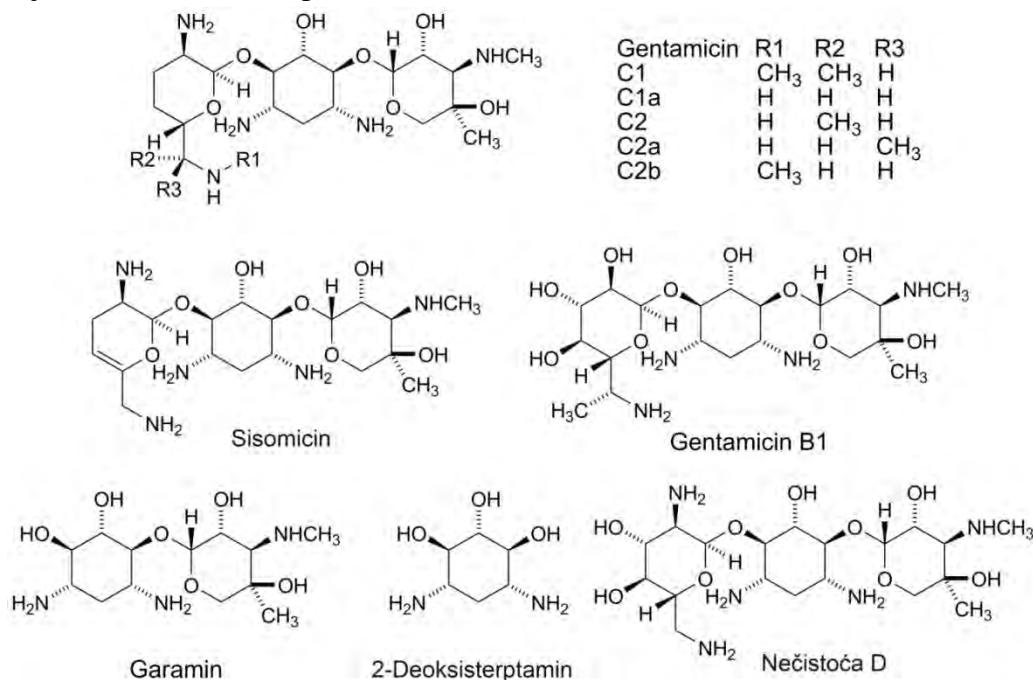
Takođe, testirane su C18 stacionarne faze i pokazano je da je faza sa dvostrukim blokiranjem slobodnih hidroksilnih grupa omogućila bolje razdvajanje u odnosu na stacionarnu fazu u kojoj postoji veći procenat slobodnih OH grupa.

Ispitan je i uticaj pH vrednosti mobilne faze i utvrđene su značajne promene u hromatografskom ponašanju komponenti sa promenama pH vrednosti. Promena pH je poakzala najizraženiji uticaj na oblik pikova, a time i na rezoluciju između C2 komponenti gentamicina. Čak su varijacije od 0,2 pH jedinice rezultirale značajnim tailing efektom pikova što je dovodilo do smanjenja rezolucije između pikova. Ovo predstavlja kritičan parametar, pošto je C2b komponenta prisutna u niskom procentu, pa je visoka rezolucija, koja obezbeđuje razdvajanje do bazne linije, neophodna kako bi se ova komponenta mogla samostalno kvantifikovati. Tipični dobijeni hromatogram za razdvajanje komponenti gentamicina je prikazan na Slici 9.



Slika 9. Tipičan hromatogram (MRM) koji prikazuje razdvajanje aktivnih komponenti gentamicina

Metoda za analizu gentamicina uključuje parametre za ispitivane komponente prikazane na Slici 10 koje su definisane u važećim farmakopejama (Evrpska farmakopeja, Britanska farmakopeja). Sve aktivne komponente i definisane nečistoće poznate strukture su detektovane i pouzdano identifikovane preko MS/MS spektara osim 2-deoksistreptamina. Takođe su detektovane neke dodatne nečistoće, što se poklapa sa rezultatima ostalih skorijih studija koje su se bavile ovom problematikom. (Grahek R., 2009), (Li B., 2011)



Slika 10. Struktura gentamicina kao aktivne komponente i njegovih nečistoća

U poređenju sa ostalim skorijim ispitivanjima, MS detekcija primenom jonske zamke kao tehnike masene spektroskopije omogućava pouzdanije rezultata identifikacije komponenti i potvrde njihove strukture, dok je za potrebe kvantifikacije korišćena pulsna elektrohemijska detekcija sa vremenom analize od 85 min. U drugoj studiji sa sličnim ciljem, QQQ maseni

spektrometar je korišćen ali samo u svrhu identifikacije uz trajanje analize od 30 min i omogućila je identifikaciju novih nečistoća gentamicina. (Grahek R., 2009), (Li B., 2011)

Kao i prethodne studije, i naše ispitivanje potvrđuje identifikaciju farmakopejski definisanih nečistoća gentamicina, ali omogućava i detekciju i identifikaciju novih nečistoća. Glavni fokus je bio kvantifikacija komponenti i ona je izvršena primenom detektora visoke selektivnosti. Takođe, osim rezultata kvantifikacije komponenti i validacije metode za primenu u rutinskoj kontroli kvaliteta, metoda omogućava sprovođenje kompletne analize u vremenu kraćem od 20 min, što može značajno povećati produktivnost i redukovati troškove analize.

5.1.1 Validacija metode za određivanje gentamicin-sulfata

Postavljena metoda za određivanje gentamicin-sulfata i njegovih nečistoća je validirana prema poslednjim ICH regulativama, što podrazumeva ispitivanje specifičnosti, linearnosti, tačnosti, preciznosti, osetljivosti i robustnosti metode. Metoda je testirana u određivanju kako aktivnih komponenti, tako i nečistoća prisutnih u farmaceutskim formulacijama koje sadrže gentamicin kao aktivnu komponentu. Ispitivani farmaceutski preparati su bili u obliku injekcija ili praška, što je omogućilo ispitivanje uticaja različitih matriksa na robustnost metode.

5.1.1.1 Specifičnost metode

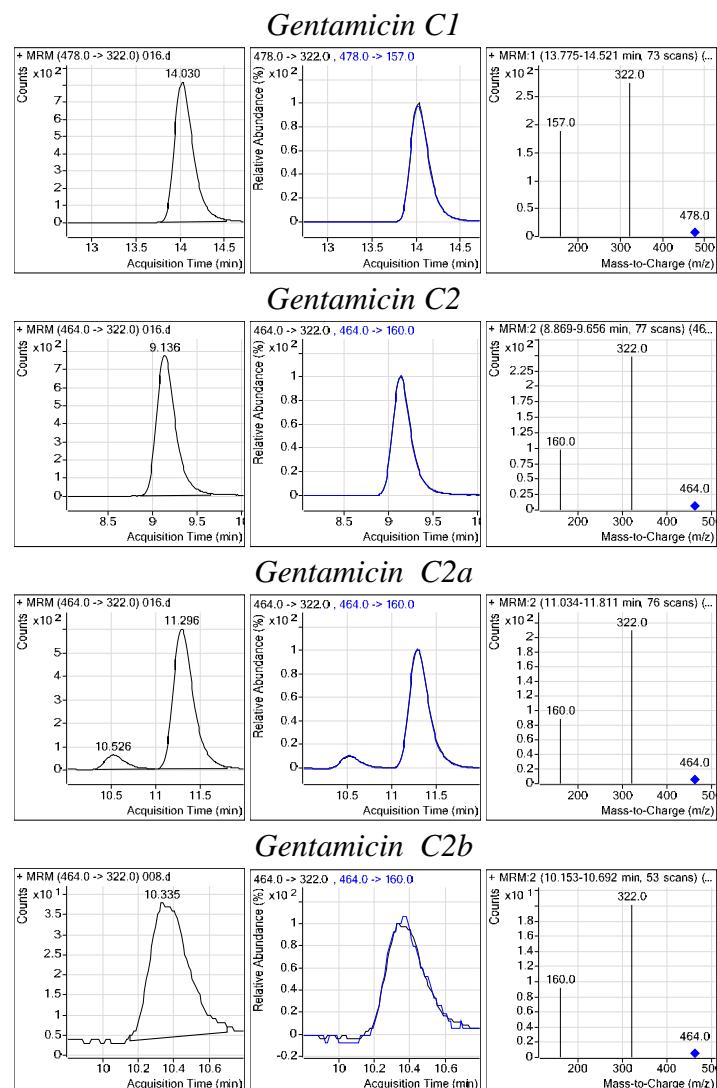
Specifičnost metode je garantovana MS/MS tranzicijama analiziranih komponenti. Prekursori i produktni joni ispitivanih komponenti su prikazani u Tabeli 7. Kvantifikacioni joni su joni koji daju najjači intenzitet odgovora, dok su kvalifikacioni joni drugi po redu po intenzitetu u spektru određene komponente. Odnos između ova dva jona mora biti konstantan kako bi se pouzdano identifikovala komponenta.

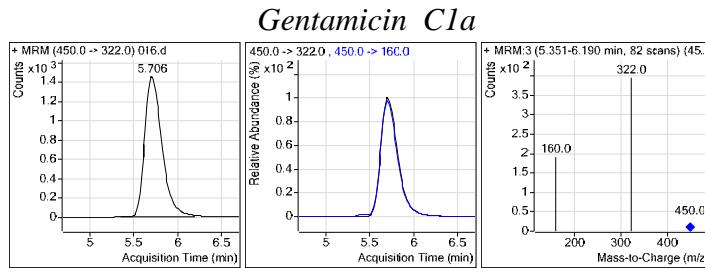
Tabela 7. Prekursori i produktni joni razvijene LC/MS/MS metode za analizu gentamicina

Komponenta	m/z	Kvantifikacioni jon	Kvalifikacioni jon
<i>Gentamicin-sulfat – aktivne komponente</i>			
Gentamicin C1	478,0	322,0	157,0
Gentamicin C1a	450,0	322,0	160,0
Gentamicin C2	464,0	322,0	160,0
Gentamicin C2a	464,0	322,0	160,0
Gentamicin C2b	464,0	322,0	160,0
<i>Gentamicin-sulfat – nečistoće</i>			
Sisomicin	448,4	254,1	270,1
Garamin	322,3	160,0	112,0

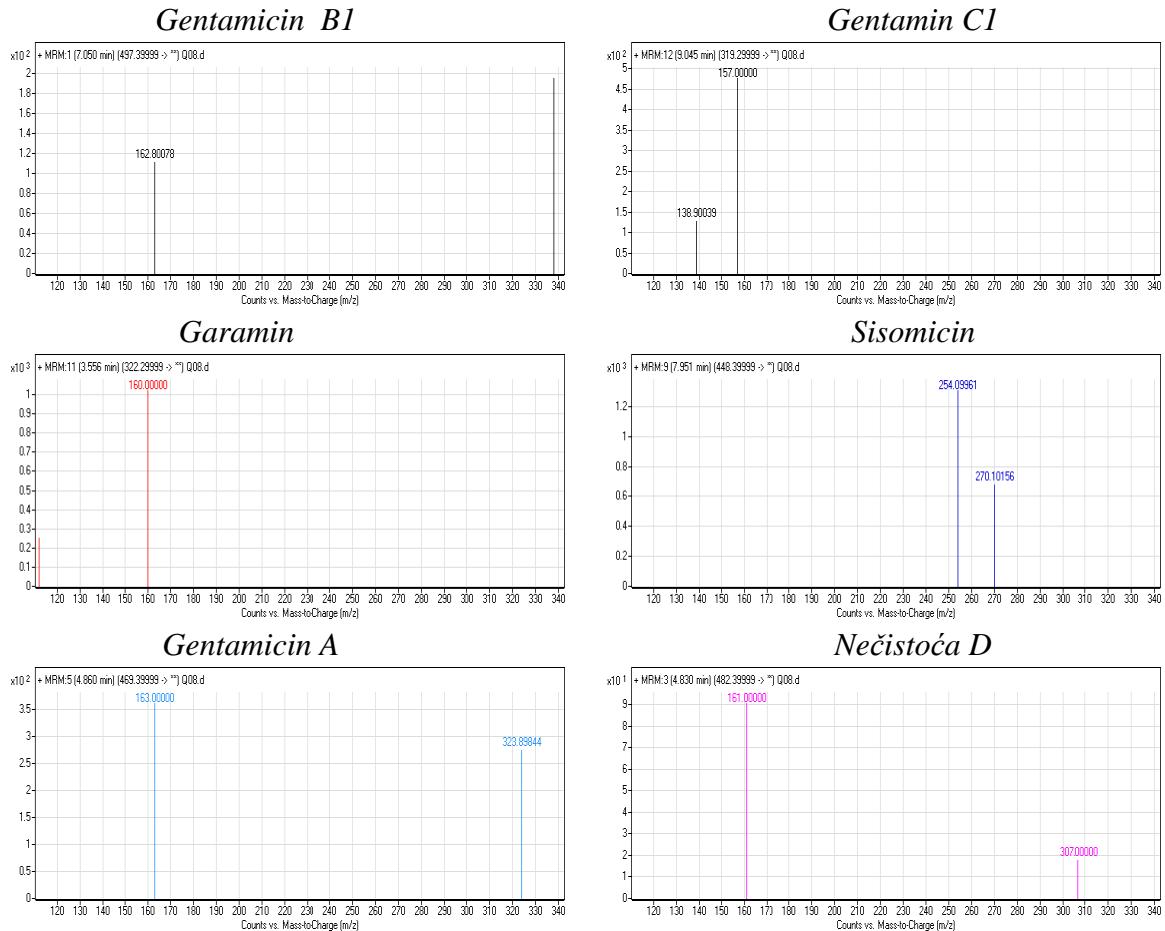
Komponenta	<i>m/z</i>	Kvantifikacioni ion	Kvalifikacioni ion
Gentamicin B1	497,4	338,0	162,8
Nečistoća D	482,4	307,0	161,0
2-Deoksistreptamine	163,0	Nije detektovan	Nije detektovan
Gentamin C1	319,3	157,0	138,9
Gentamicin B	483,4	163,0	205,0
JI-20A	482,4	161,0	307,0
Gentamicin A	469,4	163,0	323,9

Dobijeni hromatogrami, ekstrahovani po masama pojedinačnih komponenti i odgovarajući MRM spektri koji prikazuju navedene tranzicije, prikazani su na Slici 11 i Slici 12.





Slika 11. Ekstrahovani hromatogrami aktivnih komponenti i njihovi spektri



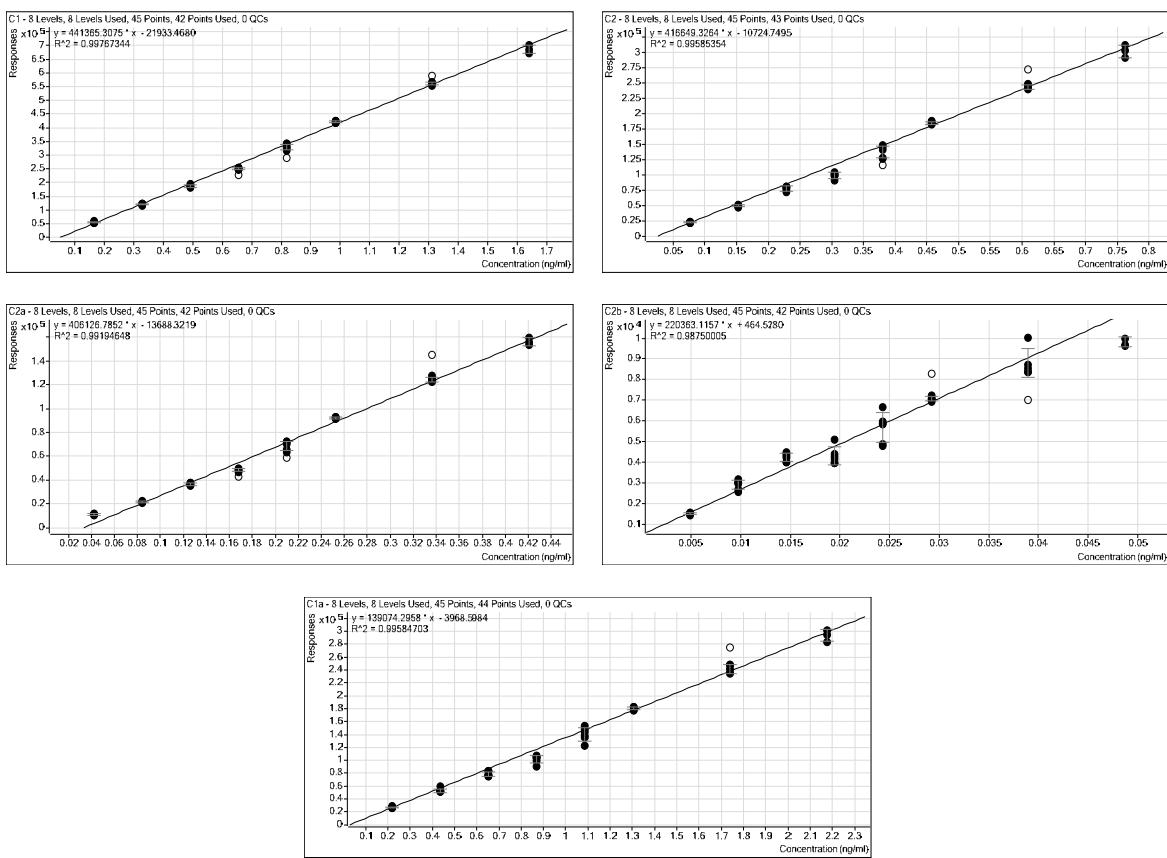
Slika 12. Spektri nečistoća gentamicina

5.1.1.2 Linearnost

Linearnost metode je ispitivana za sve aktivne komponente pojedinačno na 8 različitim koncentracijama. Dobijene kalibracione krive za radne koncentracije imaju koeficijent korelacije veći od 0,99 za svaku pojedinačnu komponentu što je prikazano u Tabeli 8, osim za gentamicin C2b, gde je koeficijent veći od 0,98. Kalibracione krive ispitivanih supstanci su prikazane i na Slici 13.

Tabela 8. Kalibracione krive metode za analizu gentamicina

Komponenta	Opseg koncentracija $\mu\text{g/mL}$	Jednačina	r^2
Gentamicin C1	16,39 – 163,9	$y=441361x-21933$	0,9977
Gentamicin C1a	21,74 – 217,4	$y=139074x-3968$	0,9958
Gentamicin C2	7,62 – 76,2	$y=416649x-10724$	0,9958
Gentamicin C2a	4,20 – 42,0	$y=406126x-13688$	0,9919
Gentamicin C2b	0,49 – 4,9	$y=220363x-464$	0,9875



Slika 13. Kalibracione krive aktivnih komponenti gentamicina

5.1.1.3 Preciznost i tačnost metode

Preciznost metode je definisana preko standardne devijacije serije od 6 injektovanja za najnižu, srednju i najvišu koncentraciju iz kalibracionog seta. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 9.

Tačnost metode je računata iz serije od 6 injektovanja uzorka sa dodatom poznatom količinom standarda (laboratorijski pripremljene smeše). Rezultati su izraženi kao procenat

recovery-ja i prikazani u Tabeli 9 za različite koncentracione nivoe koji odgovaraju 80%, 100% i 120% radne koncentracije.

Tabela 9. Preciznost i tačnost metode za analizu gentamicina

Komponenta	Preciznost			Tačnost		
	Koncentracija µg /mL	RSD [%]	Uzeto µg/mL	nadjeno µg/mL	RSD [%]	Recovery
Gentamicin C1	5,77	1,95	18,47	17,89±0,28	1,59	96,86%
	23,09	0,70	23,09	22,53±0,31	1,35	97,59%
	115,45	0,91	27,71	28,32±0,24	0,85	102,21%
Gentamicin C1a	8,81	1,97	28,18	27,38±0,30	1,11	97,17%
	35,23	1,14	35,23	33,47±0,41	1,16	95,02%
	176,15	1,11	42,28	41,37±0,65	1,58	97,86%
Gentamicin C2	5,46	1,18	17,46	16,39±0,23	1,42	93,90%
	21,83	0,74	21,83	20,73±0,27	1,31	94,97%
	109,15	1,56	26,20	26,94±0,37	1,39	102,84%
Gentamicin C2a	4,43	1,79	14,18	13,31±0,23	1,77	93,91%
	17,72	1,17	17,72	16,67±0,22	1,32	94,06%
	88,6	0,81	21,26	20,53±0,14	0,71	96,57%
Gentamicin C2b	0,53	2,12	1,70	1,70±0,05	3,21	99,83%
	2,13	1,22	2,13	2,08±0,06	2,92	97,63%
	10,65	1,87	2,56	2,56±0,08	3,19	100,01%

5.1.1.4 Robustnost

Robustnost metode je testirana variranjem temperature (34 i 30 °C) i pH vrednosti mobilne faze (2.4 i 2.6). Paramteri jonskog izvora su testirani pod promenjenim uslovima (temperatura gasa 320 °C, temperatura uparivača 220 °C i pritisak gasa na raspršivaču od 50 i 55 psi). Navedena variranja parametara nisu pokazala značajan uticaj na razdvajanje ispitivanih komponenti osim pH vrednosti mobilne faze koja je u slučaju hromatografskog razdvajanja aktivnih komponenti gentamicina kritičan parametar (promena pH vrednosti od 0,1 je dala zadovoljavajuće razdvajanje ali su se mogle primetiti promene u obliku pikova).

5.1.1.5 Osetljivost

Osetljivost metode se izražava preko limita detekcije (LOD) i limita kvantifikacije (LOQ) koji se računaju kao vrednosti pri kojima je odnos signala pika i šuma bazne linije 3 za LOD, odnosno 10 za LOQ. LOD za gentamicin C2b, komponentu koja je prisutna u najnižoj

konzentraciji u gentamicinu, iznosi 9,85 ng/mL dok je LOQ 32,85 ng/mL. Očekuju se da ove vrednosti budu znatno niže za MS/MS detekciju, ali mobilna faza koja sadrži TFA i TEA kao dobro poznate supresore jonizacije, smanjuje osetljivost metode. Kako je razvijena metoda namenjena za rutinsku kontrolu kvaliteta farmaceutskih formulacija, osetljivost metode nije kritičan parametar, već je to mogućnost pojedinačnog određivanja ispitivanih komponenti prisutnih u formulacijama, što je i postignuto hromatografskim razdvajanjem uz primenu mobilne faze koja sadrži TFA i TEA.

5.1.2 Analiza uzoraka koji sadrže gentamicin-sulfat

Razvijena metoda je primenjena za određivanje aktivnih komponenti i nečistoća u doziranim oblicima koji sadrže gentamicin-sulfat u injekcijama i u prašku. Kod ispitivanih uzoraka rađeno je određivanje sadržaja aktivne komponente i poređena njegova usklađenost sa deklarisanim sadržajem. Takođe je rađeno određivanje sadržaja prisutnih nečistoća i provera usklađenosti njihove koncentracije sa propisanim standardima za dozvoljene koncentracije pojedinačnih u ukupnih nečistoća u preparatima. Dobijeni rezultati, prikazani u Tabeli 10 i Tabeli 11., u skladu su sa postavljenim regulativnim zahtevima propisanim farmakopejskim propisima. Uticaj matriksa je bio naglašeniji kod praška, pošto je prisustvo šećera u doziranom obliku dodatno redukovalo efikasnost jonizacije.

Tabela 10. Rezultati dobijeni za sadržaj aktivne komponente u komercijalno dostupnim formulacijama gentamicina

Dozirani oblik	Nađeno mg		RSD [%], n=6		Procenat deklarisanog sadržaja	
	Gentamicin	Linkomicin	Gentamicin	Linkomicin	Gentamicin	Linkomicin
Neogent® injekcije	81,88	/	1,03	/	102,36	/
Neolincogent® prašak	9,88	357,23	1,13	1,09	98,78	99,23

Tabela 11. Rezultati dobijeni za sadržaj nečistoća u uzorcima gentamicin-sulfata

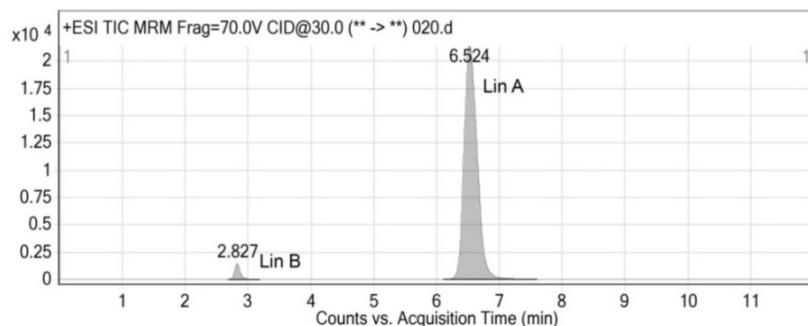
Nečistoća	Neosulfox P® prašak	Neomycin 25%® prašak	Sirovina gentamicin-sulfata
<i>Nečistoće gentamicina</i>			
Sisomicin	2,19%	2,02%	1,97%
Garamin	0,21%	0,17%	0,09%
Gentamicin B1	/	/	/
Nečistoća D	/	/	/
2-Deoksistreptamin	/	/	/
Gentamin C1	0,83%	0,59%	0,56%

Nečistoća	Neosulfox P® prašak	Neomycin 25%® prašak	Sirovina gentamicin-sulfata
Gentamicin B	/	/	/
Gentamicin A	/	/	/

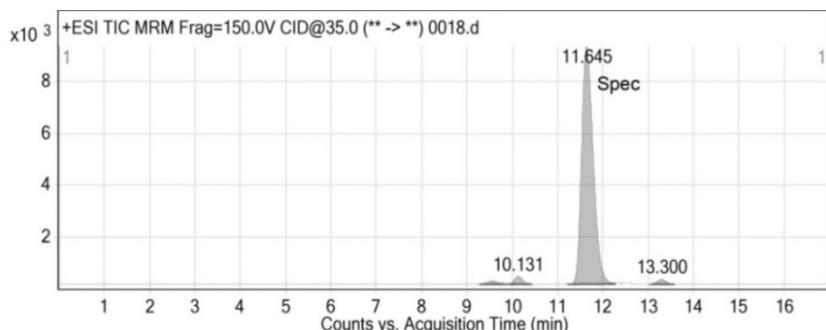
5.2 Određivanje linkomicin-hidrohlorida i spektinomicin-dihidrohlorida

Metode razvijene za određivanje linkomicin-hidrohlorida i spektinomicin-dihidrohlorida su takođe bile fokusirane na postizanje potrebnog hromatografskog razdvajanja, korišćenjem adekvatne mobilne faze. Stoga su testirane mobilne faze različitih sastava i najbolje razdvajanje je postignuto primenom mobilne faze koja sadrži TFA. Međutim, primena TFA je uticala na odgovor sistema i smanjila osetljivost metode (TFA poznati supresor jonizacije). Ali, kako osetljivost metode nije bila kritičan parametar već je to kompletno razdvajanje svih pojedinačnih komponenti prisutnih u farmaceutskom doziranom obliku, TFA je zadržana kao dodatak mobilnoj fazi.

Tipični hromatogrami razdvajanja linkomicin-hidrohlorida i spektinomicin-dihidrohlorida su prikazani na Slici 14 i Slici 15.



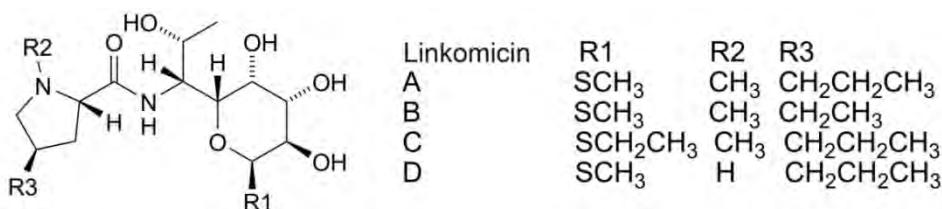
Slika 14. Tipičan hromatogram (MRM) koji prikazuje razdvajanje aktivnih komponenti linkomicina



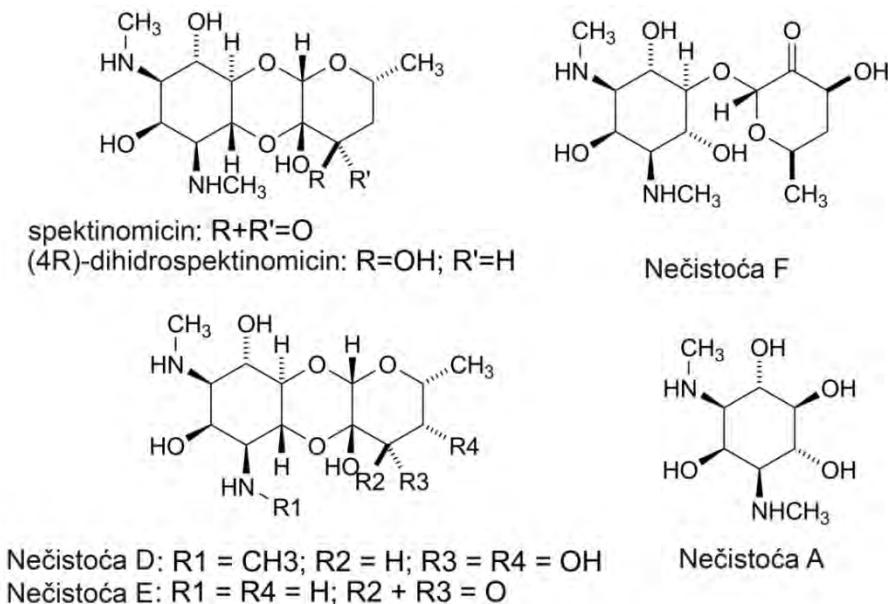
Slika 15. Tipičan hromatogram (MRM) koji prikazuje razdvajanje aktivnih komponenti spektinomicina

Metode za analizu linkomicina i spektinomicina uključuju parametre za ispitivanje komponenti prikazanih na Slici 16 i Slici 17 koje su definisane u važećim farmakopejama (Council of Europe, 2011.)(Commission, 2010)(United States Pharmacopoeial Convention.,

2007). Sve aktivne komponente i definisane nečistoće su detektovane i pouzdano identifikovane.



Slika 16. Struktura linkomicina kao aktivne komponente i njegovih nečistoća



Slika 17. Struktura spektinomicina kao aktivne komponente i njegovih nečistoća

Razvijena metoda za analizu linkomicin-hidrohlorida ukazala je na prisustvo jedne dodatne nečistoće u komercijalnom linkomicinu koja je eluirala na retencionom vremenu od 5,52 min i koja do sada nije prijavljena u literaturi. Tačnu strukturu ove komponente tek treba utvrditi, iako se može pretpostaviti da potiče od degradacije linkomicina (razlika od 2 amu jedinice u molekulskoj masi sugerise da je verovatno došlo do oksidacije na alkoholnoj funkcionalnoj grupi linkomicina A). Takođe, interesantno je da je za linkomicin i njegove nečistoće bilo problematično odrediti pouzdane kvalifikacione jone, pošto njihov odnos sa kvantifikacionim jonima nije potpuno stabilan.

Ostale studije koje su se bavile ispitivanjem linkomicina uglavnom su ispitivale samo aktivnu komponentu i to u biološkom materijalu.(27, 32, 34, 38-39) (Carretero V., 2008), (Loffler D., 2003), (Oertel, 2004), (W-M. Sin D., 2004), (W-X. Zhu, 2008). Razvijena metoda, koja je ovde prezentovana, je validirana za upotrebu u procesu kontrole kvaliteta sa

vremenom analize do 10 min što omogućava pouzdanu i brzu analizu sa povećanjem produktivnosti.

Ostale studije koje su se bavile ispitivanjem spektinomicina, uglavnom su koristile amperometrijski detektor ili evaporative light scattering detektor za detekciju i uglavnom su takođe proučavale samo aktivnu komponentu. (Yan H. D., 2009). U ispitivanju koje je uključivalo analizu srodnih supstanci korišćen je evaporative light scattering detektor za kvantifikaciju i maseni spektrometar zasnovan na tehnici jonske zamke za određivanje strukture ispitivanih komponenti. (Wang J., 2006), (Peru K. M., 2006). Ovo ispitivanje uključuje postavku metode koja primenom tandem masene QQQ spektrometrije kao selektivne tehnike omogućava identifikaciju i kvantifikaciju ispitivanih komponenti.

Kako su osnovni parametri za analizu linkomicina i spektinomicina isti, ista metoda se može primeniti za kompletну analizu uzoraka koji sadrže smešu ove dve aktivne komponente.

5.2.1 Validacija metode

Metoda je testirana u određivanju kako aktivnih komponenti, tako i nečistoća prisutnih u farmaceutskim formulacijama koje sadrže linkomicin i/ili spektinomicin kao aktivnu komponentu. Ispitivani farmaceutski preparati su bili u obliku injekcija ili praška, što je omogućilo ispitivanje različitih uticaja matriksa na robustnost metode.

5.2.1.1 Specifičnost metode

Specifičnost metode je garantovana MS/MS tranzicijama analiziranih komponenti. Prekursori i produkt joni ispitivanih komponenti su prikazani u Tabeli 12.

Tabela 12. Prekursori i produkt joni razvijene LC/MS/MS metode za analizu linkomicina i spektinomicina

Komponenta	m/z	Kvantifikator jon	Kvalifikator jon
<i>Linkomicin-hidrohlorid – aktivne komponente</i>			
Linkomicin A	407,3	126,3	359,3*
<i>Linkomicin-hidrohlorid – nečistoće</i>			
Linkomicin B	393,2	112,3	70,1*
Nepoznata nečistoća	405,3	124,2	**
<i>Spektinomicin-dihidrohlorid – aktivne komponente</i>			
Spektinomicin	333,3	140,0	98,2
<i>Spektinomicin-dihidrohlorid – nečistoće</i>			
Nečistoća A	207,2	73,0	43,5

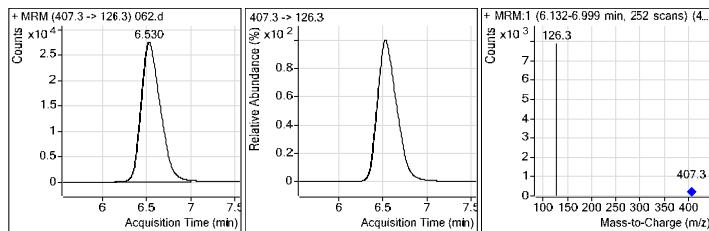
Komponenta	<i>m/z</i>	Kvantifikator ion	Kvalifikator ion
Nečistoća D	351,3	207,0	98,0
Nečistoća E	319,2	73,4	43,0
Nečistoća F	333,2	139,9	97,7
Nečistoća 4R	335,2	116,0	98,0

* date vrednosti su potencijalni kvalifikacioni joni (drugi nisu detektovani) ali zbog njihovog relativno niskog intenziteta se smatraju nepouzdanim.

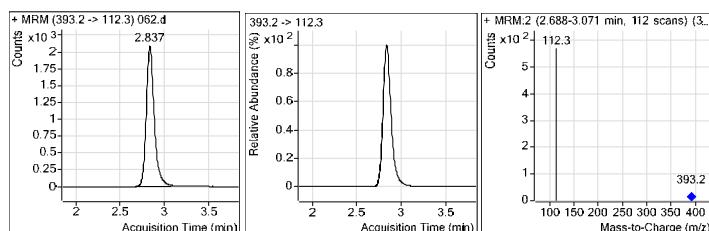
** MS/MS spektar je sadržao samo jedan produkt ion.

Dobijeni hromatogrami ekstrahovani po masama pojedinačnih komponenti i odgovarajući spektri koji prikazuju navedene tranzicije su prikazani na Slici 18 i Slici 19.

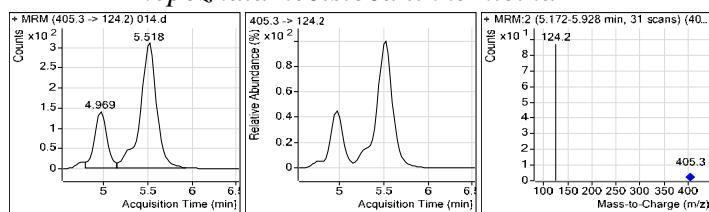
Linkomicin A



Linkomicin B

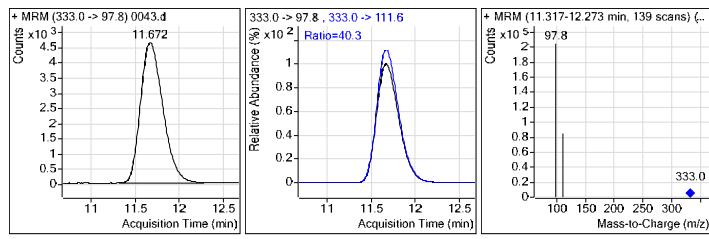


Nepoznata nečistoća linkomicina A

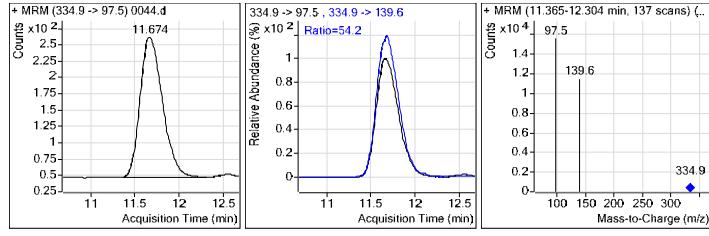


Slika 18. Ekstrahovani hromatogrami linkomicina i njegovih nečistoća i njihovi spektri

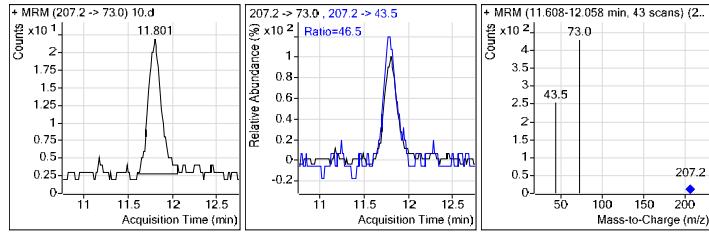
Spektinomicin



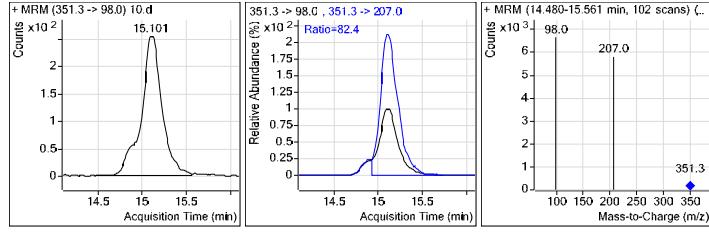
4R-Spektinomicin



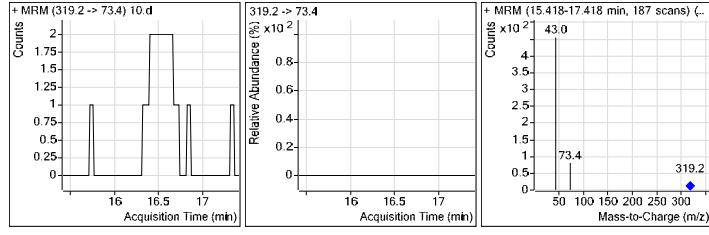
Nečistočá A



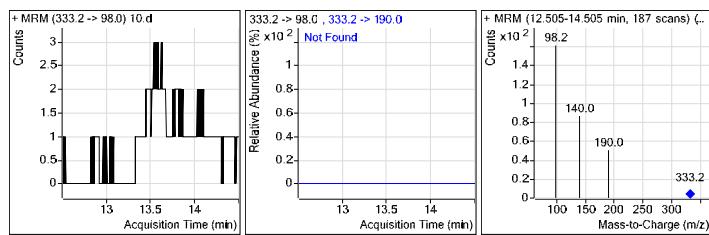
Nečistočá D



Nečistočá E



Nečistoća F



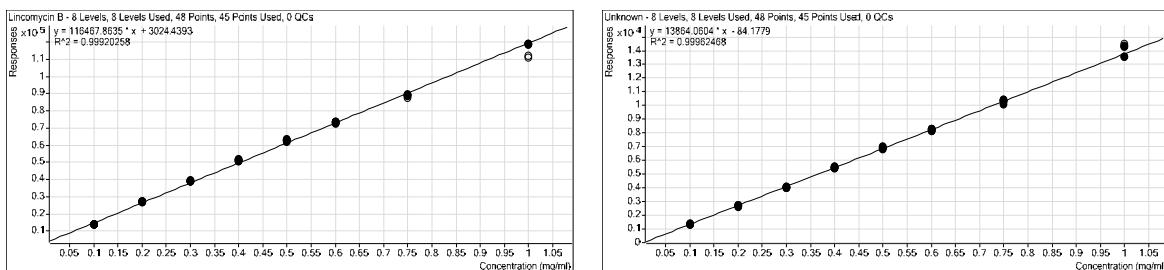
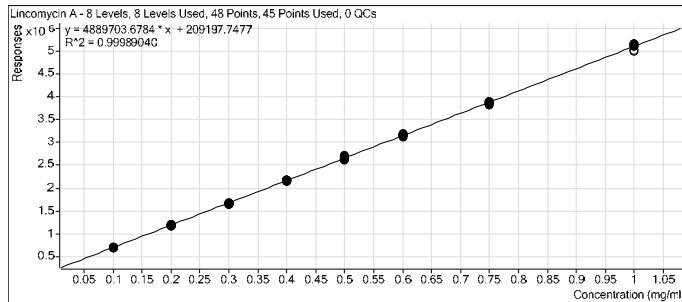
Slika 19. Ekstrahovani hromatogrami spektinomicina i njegovih nečistoća i njihovi spektri

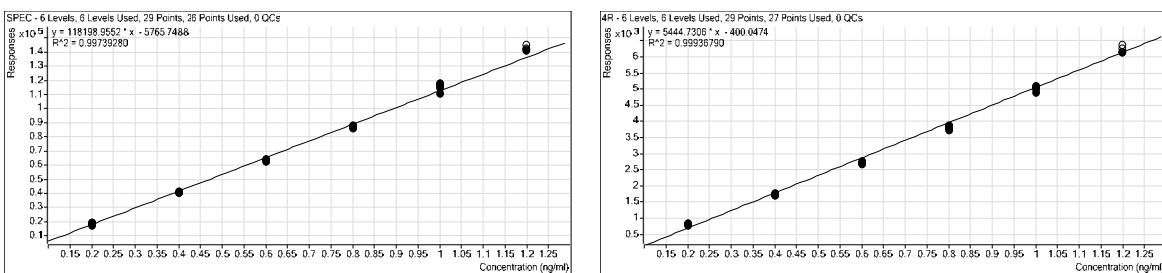
5.2.1.2 Linearnost

Linearnost metode je ispitivana za aktivne komponente linkomicina i spektinomicina pojedinačno na 6 različitih koncentracija. Dobijene kalibracione krive za radne koncentracije imaju koeficijent korelacije veći od 0,99 za svaku pojedinačnu komponentu što je prikazano u Tabeli 13. Kalibracione krive ispitivanih supstanci su prikazane i na Slici 20.

Tabela 13. Kalibracione krive metode za analizu linkomicina i spektinomicina

Komponenta	Opseg koncentracija µg/mL	Jednačina	r^2
Linkomicin A	10,0 – 100,0	$y=48897x+2092$	0,9999
Spektinomicin	10,0 – 100,0	$y=118198x-5766$	0,9974





Slika 20. Kalibracione krive aktivnih komponenti linkomicina i spektinomicina i određenih nečistoća

5.2.1.3 Preciznost i tačnost metode

Preciznost metode je definisana preko standardne devijacije serije od 6 injektovanja za najnižu, srednju i najvišu koncentraciju iz kalibracionog seta. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 14.

Tačnost metode je računata iz serije od 6 injektovanja uzorka sa dodatom poznatom količinom standarda (laboratorijski pripremljene smeše). Rezultati su izraženi kao procenat *recovery-ja* i prikazani u Tabeli 14 za različite koncentracione nivoe koji odgovaraju 80%, 100% i 120% radne koncentracije.

Tabela 14. Preciznost i tačnost metode za analizu linkomicina i spektinomicina

Komponenta	Koncentracija µg /mL	Preciznost		Tačnost		
		RSD [%]	Uzeto µg/mL	nadjeno µg/mL	RSD [%]	Recovery
Linkomicin A	10,0	0,32	40,0	40,04±0,17	0,42	100,12%
	50,0	0,40	50,0	50,05±0,66	1,33	100,11%
	100,0	0,70	60,0	60,44±0,45	0,75	100,73%
Spektinomicin	10,0	1,00	40,0	40,04±0,38	0,38	100,09%
	50,0	0,71	50,0	51,20±0,60	1,11	99,60%
	100,0	1,18	60,0	58,21±0,46	0,79	97,12%

5.2.1.4 Robustnost

Robustnost metode je testirana variranjem temperature (23 i 27 °C) i procentom TFA u mobilnoj fazi (0,04 i 0,06%). Parametri jonskog izvora su testirani pod promenjenim uslovima (temperatura gasa 320 °C, temperatura uparivača 220 °C i pritisak gasa na raspršivaču od 50 i 55 psi). Navedena variranja parametara nisu pokazala značajan uticaj na razdvajanje ispitivanih komponenti i potvrdila su da je postavljena metoda robustna.

5.2.1.5 Osetljivost

Osetljivost metoda je izražena preko LOD i LOQ kao i kod gentamicina. LOD i LOQ za linkomicin su 4,21 i 14,03 ng/mL, dok su ove vrednsoti za spektinomicin 12,36 i 41,2 ng/mL. I kod ovih metoda je prisustvo TFA kao poznatog supresora uticalo na smanjenje osetljivosti metoda.

5.2.2 Analiza uzoraka linkomicina i spektinomicina

Razvijena metoda je primenjena za određivanje aktivnih komponenti u doziranim oblicima koji sadrže linkomicin-hidrohlorid i/ili spektinomicin-dihidrohlorid u injekcijama i u prašku. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 15. Uticaj matriksa je bio naglašeniji kod praška pošto je prisustvo šećera u doziranom obliku dodatno redukovalo efikasnost ionizacije.

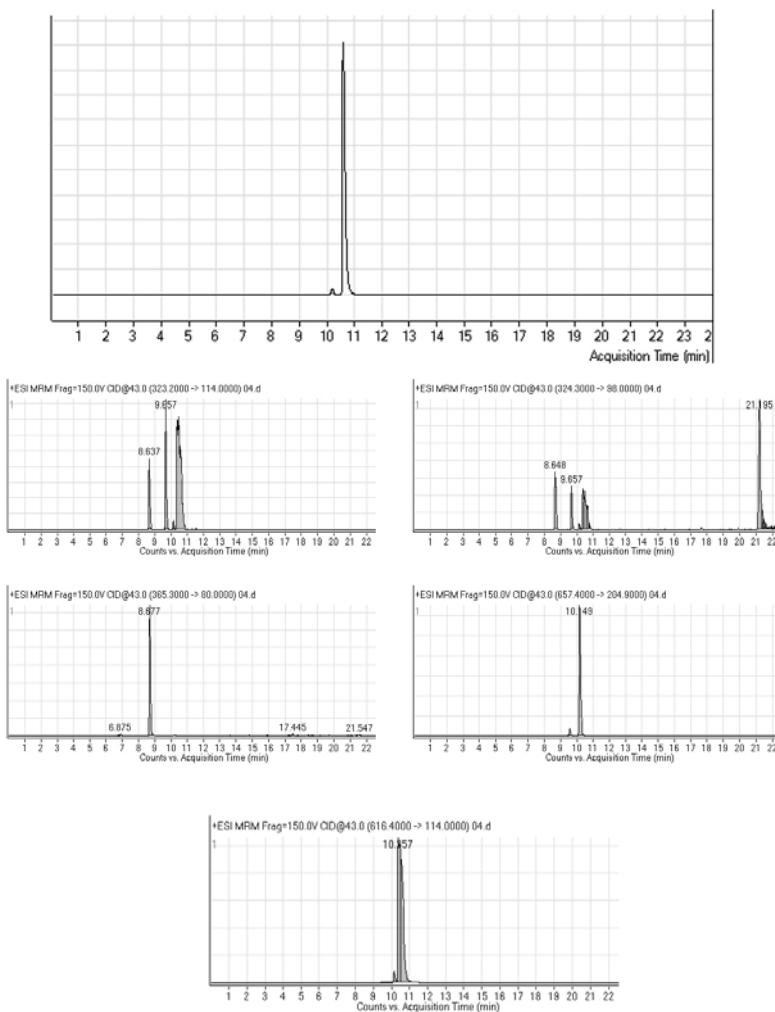
Tabela 15. Rezultati dobijeni za komercijalno dostupne formulacije linkomicina i spektinomicina

Dozirani oblik	Nađeno mg			RSD [%], n=6			Procenat deklarisanog sadržaja		
	Gentamicin	Linkomicin	Spektinomicin	Gentamicin	Linkomicin	Spektinomicin	Gentamicin	Linkomicin	Spektinomicin
Neolincogent® prašak	9,88	357,23	/	1,13	1,09	/	98,78	99,23	/
Neoli-spec® injekcije	/	50,90	100,16	/	0,45	1,06	/	101,8	100,16
Neoli-spec P-44® prašak	/	21,8	21,7	/	0,69	0,59	/	99,09	99,86

5.3 Određivanje neomicin-sulfata

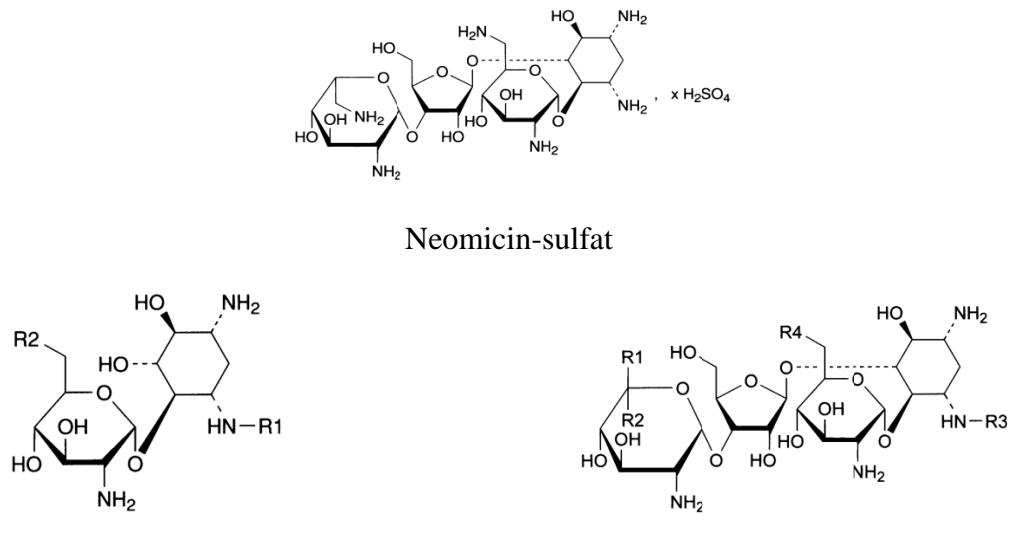
Kao i kod ostalih aminoglikozidnih antibiotika koji su ispitivani u ovoj studiji, i kod neomicin-sulfata je glavni izazov bio primena adekvatne detekcije uz postizanje hromatografskog razdvajanja komponenti iste molekulske mase(isti joni). Za postizanje ovog razdvajanja dodavana je heptafluorbuterna kiselina (HFBA) mobilnoj fazi, što je takođe uzrokovalo smanjenje osetljivosti metode pošto je i HFBA značajan supresor jonizacije. Kao i u prethodnim slučajevima, zbog njene predviđene primene, i kod ove metode osetljivost ne predstavlja kritičan parametar.

Tipični hromatogrami razdvajanja neomicin-sulfata i njegovih nečistoća su prikazani na Slici 21.



Slika 21. Tipični hromatogrami (MRM) koji prikazuju razdvajanje aktivnih komponenti neomicina i njegovih nečistoća

Metoda razvijena za analizu neomicina uključuje parametre za ispitivanje komponenti prikazanih na Slici 22 koje su definisane važeći farmakopejskim propisima.



Komponenta	R1	R2	Compound	R1	R2	R3	R4
Neamin	H	NH ₂	Neomycin C	CH ₂ -NH ₂	H	H	NH ₂
3-Acetylneamin	CO-CH ₃	NH ₂	Neomycin E	H	CH ₂ -NH ₂	H	OH
Neomycin D	H	OH	Neomycin F	CH ₂ -NH ₂	H	H	OH
			Neomycin B-LP	H	CH ₂ -NH ₂	C(O)-CH ₃	NH ₂

Slika 22. Struktura neomicina kao aktivne komponente i njegovih nečistoća

Ostale studije koje su se bavile ispitivanjem neomicina uglavnom su se bazirale na ispitivanju samo aktivne komponente neomicina i to uglavnom u biološkom materijalu. Ovo ispitivanje omogućava analizu neomicina i njegovih nečistoća primenom selektivnog detektora sa vremenom analize kraćim od 25 min.

5.3.1 Validacije metode za određivanje neomicina

Metoda je testirana u određivanju kako aktivnih komponenti, tako i nečistoća prisutnih u farmaceutskim formulacijama koje sadrže neomicin i/ili oksitetraciklin kao aktivnu komponentu. Ispitivani farmaceutski preparati su bili u obliku injekcija ili praška, što je omogućilo ispitivanje različitih uticaja matriksa na robustnost metode.

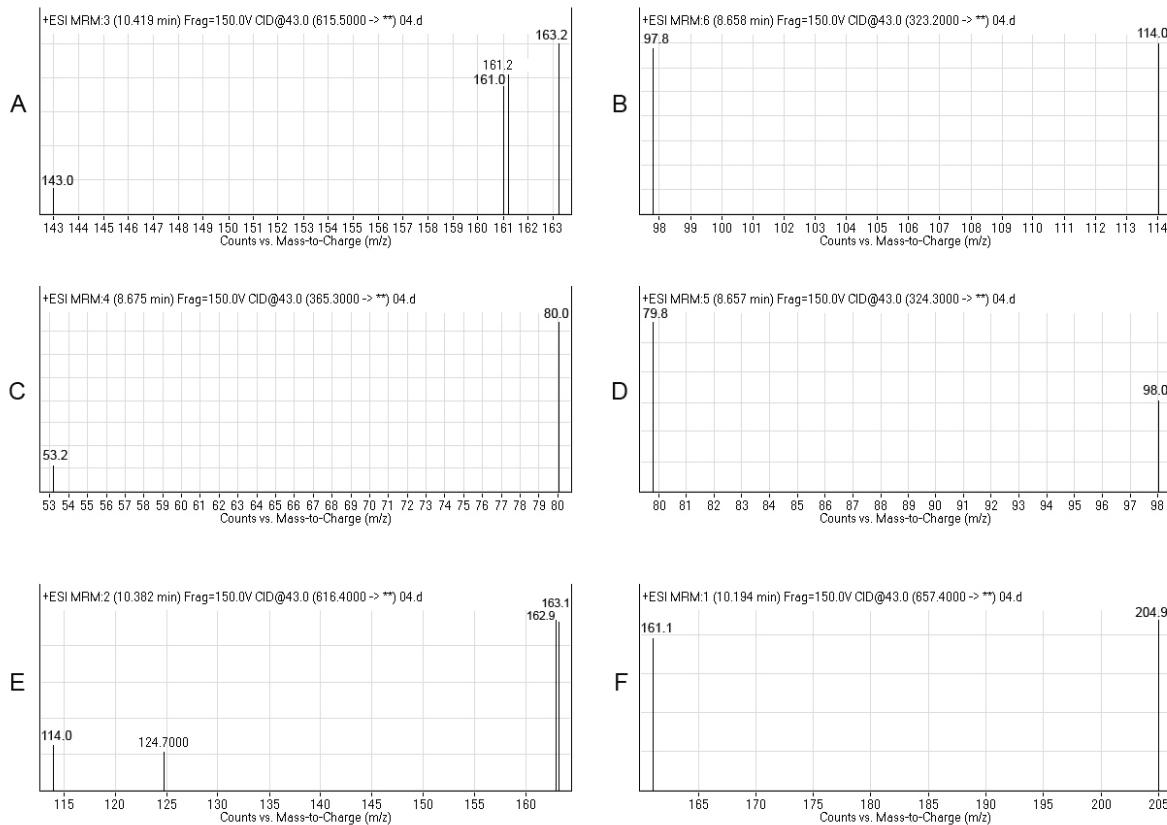
5.3.1.1 Specifičnost metode

Specifičnost metode je garantovana MS/MS tranzicijama analiziranih komponenti. Prekursori i produkt joni ispitivanih komponenti je prikazan u Tabeli 16.

Tabela 16. Prekursori i produktoni razvijene LC/MS/MS metode za analizu neomicina

Komponenta	<i>m/z</i>	Kvantifikator jon	Kvalifikator jon
<i>Neomicin – aktivna komponenta</i>			
Neomicin	615,5	163,2	161,2
<i>Neomicin – nečistoće</i>			
Neamin	323,2	114,0	97,8
3-Acetylneamin	365,3	80,0	53,2
Neomicin C	615,5	161,0	143,0
Neomicin D	324,3	98,0	79,8
Neomicin E	616,4	162,9	124,7
Neomicin F	616,4	163,1	114,0
Neomicin B-LP	657,4	204,9	161,1

Dobijeni MS/MS spektri ispitivanih supstanci su prikazani na Slici 23.



Slika 23. MS/MS spektri neomicina i njegovih nečistoća

Slika 5A – MS/MS spektri neomicina i neomicina C

Slika 5B – MS/MS spektar neamina,

Slika 5C – MS/MS spektar 3-acetilneamina,

Slika 5D – MS/MS spektar neomicina D,

Slika 5E – MS/MS spektri neomicina E i neomicina F,

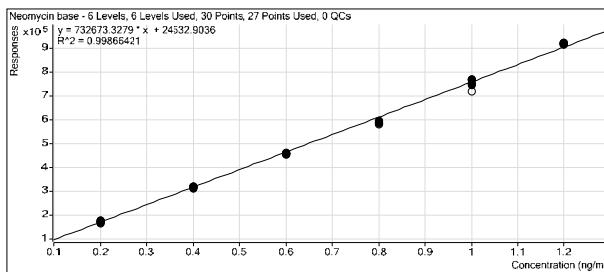
Slika 5F – MS/MS spektar neomicina B-LP

5.3.1.2 Linearnost

Linearnost metode je ispitivana za aktivnu komponentu neomicin na 6 različitih koncentracija. Dobijena kalibraciona kriva za radne koncentracije ima koeficijent korelacije veći od 0.99 i prikazana je u Tabeli 17. Kalibraciona kriva neomicina je prikazana na Slici 24.

Tabela 17. Kalibraciona kriva metode za analizu neomicina

Komponenta	Opseg koncentracija µg/mL	Jednačina	r^2
Neomicin	10,0 – 120,0	$y=732673 x+24532$	0,9989



Slika 24. Kalibraciona kriva neomicina

5.3.1.3 Preciznost i tačnost metode

Preciznost metode je definisana preko standardne devijacije serije od 6 injektovanja za najnižu, srednju i najvišu koncentraciju iz kalibracionog seta. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 18.

Tačnost metode je računata iz serije od 6 injektovanja uzorka sa dodatom poznatom količinom standarda (laboratorijski pripremljene smeše). Rezultati su izraženi kao procenat *recovery-ja* i prikazani u Tabeli 18 za različite koncentracione nivoe koji odgovaraju 80%, 100% i 120% radne koncentracije.

Tabela 18. Preciznost i tačnost metode za analizu neomicina

Komponenta	Preciznost		Tačnost			
	Koncentracija µg /mL	RSD [%]	Uzeto µg/mL	nadjeno µg/mL	RSD [%]	Recovery
Neomicin	10,0	0,56	40,0	40,5±0,1	0,56	101,2%
	50,0	0,34	50,0	50,8±0,4	0,26	101,5%
	120,0	0,69	60,0	60,4±0,1	0,34	100,7%

5.3.1.4 Robustnost

Robustnost metode je testirana variranjem temperature (25 i 30 °C) i vrednosti pH mobilne faze (2,4 i 2,6). Parametri jonskog izvora su testirani pod promenjenim uslovima (temperatura gasa 320 °C, temperatura uparivača 220 °C i pritisak gasa na raspršivaču od 50 i 55 psi). Navedena variranja parametara nisu pokazala značajan uticaj na razdvajanje ispitivanih komponenti.

5.3.1.5 Osetljivost metode

Osetljivost metode je izražena preko LOD i LOQ vrednosti koje iznose 8,83 i 29,41 ng/mL. Kao i kod prethodno razvijenih metoda, i kod ove metode je prisustvo TFA kao poznatog supresora ionizacije uticalo na smanjenje osetljivosti metode.

5.3.2 Analiza uzoraka neomicina

Metoda je primenjena u analizi komercijalno dostupnih doziranih oblika u kojima je uradjeno određivanje kako sadržaja aktivnih komponenti, tako i prisustvo nečistoća. Dozirani oblici su sadržali neomicin ili neomicin i oksitetraciklin kao aktivne komponente a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 19.

Tabela 19. Rezultati dobijeni za komercijalno dostupne formulacije neomicina

Dozirani oblik	Nađeno, mg		RSD [%], n=6		Procenat deklarisanog sadržaja, %	
	Neomicin	Oksitetraciklin	Neomicin	Oksitetraciklin	Neomicin	Oksitetraciklin
Neomycin 25% [®] prašak	251,8±0,7	/	0,27	/	100,7	/
Neosulfox P [®] prašak	61,7±0,4	40,6±0,3	0,97	0,86	102,8	101,5

Takođe je radjeno određivanje prisustva nečistoća u ispitivanim formulacijama i koncentracija nečistoća je izražena kao procenat aktivne komponente. Rezultati su prikazani u Tabeli 20.

Tabela 20. Rezultati dobijeni za određivanje nečistoća u komercijalno dostupnim formulacijama oksitetraciklina

Nečistoća	Neosulfox P® prašak	Neomycin 25%® prašak
<i>Nečistoće neomicina</i>		
Neamin	1,1%	0,9%
3-acetilneamine	/	/
Neomicin C	5,64%	6,34%
Neomicin D	/	/
Neomicin E	/	/
Neomicin F	/	/
Neomicin B-LP	0,86%	0,75%

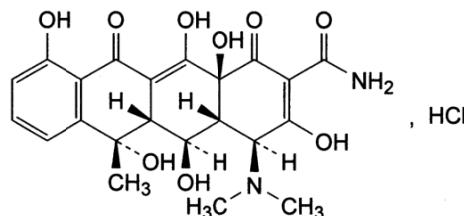
5.4 Određivanje oksitetraciklin-hidrohlorida

Glavni cilj u razvoju metode za ispitivanje oksitetraciklina i njegovih nečistoća je bilo postizanje razdvajanja primenom jednostavne mobilne faze. Prema propisima iz važećih farmakopeja (4, 6, 11) (Council of Europe, 2011.)(Commission, 2010)(United States Pharmacopoeial Convention., 2007), mobilna faza za analizu oksitetraciklina je smeša terc-butanol, 0,33 M fosfatnog pufera pH 7,5, 10 g/L rastvora tetrabutilamonijum-hidrogen sulfata – pH 7,5 podešen pomoću rastvora natrijum-hidroksida i 0,4 g/L rastvora natrijum-edetata – pH 7,5, takođe podešen primenom rastvora natrijum-hidroksida. Mobilna faza ovakvog sastava daje dobro razdvajanje komponenti, ali se postavlja pitanje održavanja kolona i instrumencije, kao i potrebnog vremena i troška za ispiranje i održavanje sistema. Za potrebe naše analize, primjeno je gradijentno eluiranje kako bi se postiglo hromatografsko razdvajanje nečistoća koje predstavljaju izomere istih molekulske masa, a time i jonskih tranzicija koje se dobijaju prilikom jonizacije u masenom detektoru. Takođe, važan cilj je bio i skraćivanje trajanja vremena analize pošto je metoda namenjena rutinskoj kontroli kvaliteta farmaceutskih doziranih oblika pa je produktivnost bitan faktor.

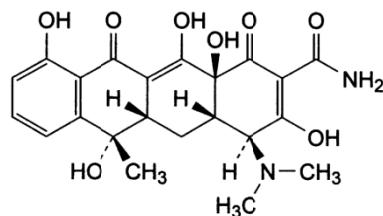
Razvoj metode je uključivao ispitivanje mobilnih faza različitog sastava koje su se zasnivale na prisustvu mravlje ili sirčetne kiseline. Ove kombinacije su dale zadovoljavajuće rezultate po pitanju osetljivosti metode i jonizacije, ali nije postignuto potrebno razdvajanje komponenti. Dalje ispitivanje je uključilo primenu trifluorosirčetne kiseline, što je rezultiralo adekvatnom rezolucijom i smanjenjem osetljivosti metode zbog poznatog efekta supresije jonizacije u prisustvu TFA. Kao i u prethodnim metodama, zbog prirode uzoraka osetljivost metode nije bio kritičan parametar, pa je 0,3% vodeni rastvor TFA u kombinaciji sa metanolom izabran kao najadekvatnija mobilna faza za ovu aplikaciju. Takođe, sličnost u strukturama i hromatografskom ponašanju ispitivanih komponenti zahtevalo je sporu promenu sastava mobilne faze pri početku analize i povećanje procenta organske faze pri kraju analize.

Ovakva promena sastava mobilne faze zahtevala je dodatno vreme za regeneraciju kolone nakon završene analize (post time) kako bi se ponovo postigli početni uslovi.

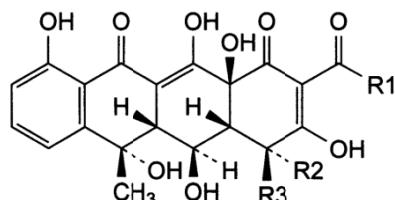
Primenom mobilne faze u navedenom sastavu pri gradijentnom eluiranju prikazanom u Tabeli 6 i ostalim eksperimentalnim uslovima, postignuto je adekvatno hromatografsko razdvajanje komponenti prikazanih na Slici 25, uz njihovu identifikaciju i kvantifikaciju za vreme trajanja analize od 18 min.



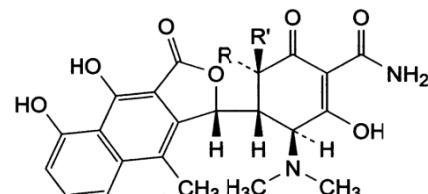
Oksitetraciklin-hidrohlorid



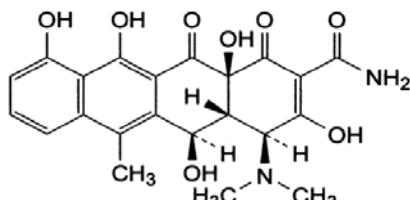
Nečistoća B



Komponenta	R1	R2	R3
Nečistoća A	NH2	N(CH3)2	H
Nečistoća C	CH3	H	N(CH3)2



Komponenta	R	R'
Nečistoća D	OH	H
Nečistoća E	H	OH



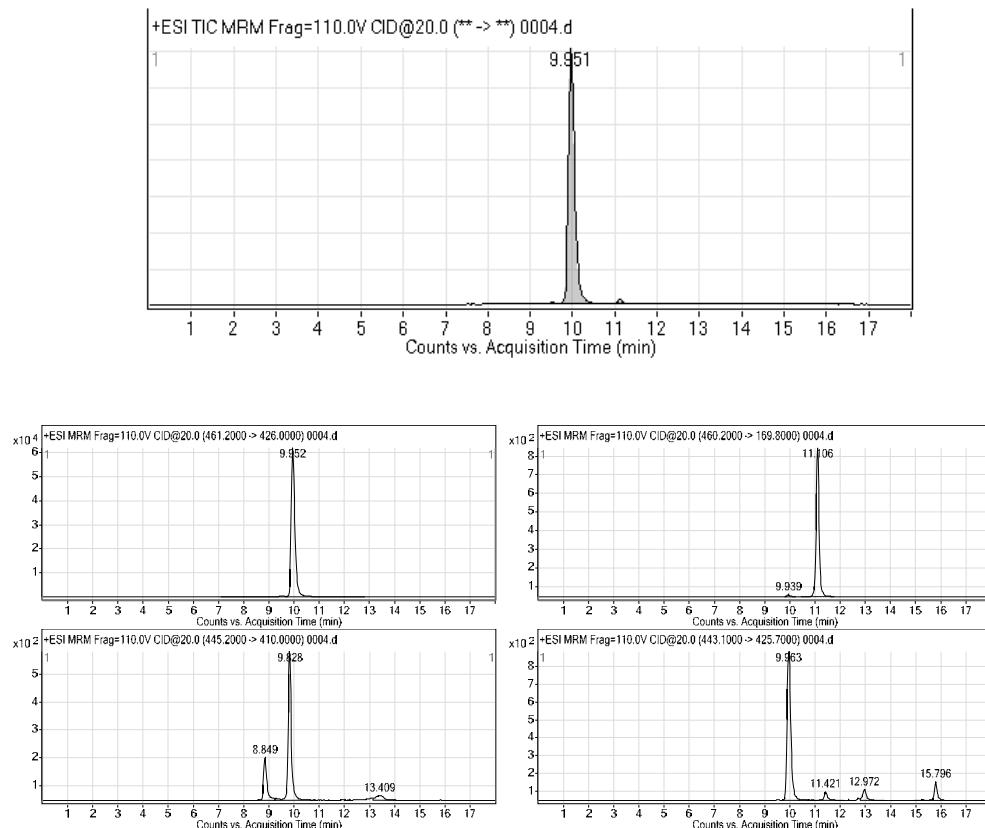
Nečistoća F

Slika 25. Struktura oksitetraciklina kao aktivne komponente i njegovih nečistoća

Nečistoće definisane važećim farmakopejskim propisima su identifikovane a njihova koncentracija je izražena kao procenat aktivne komponente (ovo je izračunato kroz odnos

površina pikova nečistoće i pik aktivne komponente (4, 6, 11) (Council of Europe, 2011.) (Commission, 2010) (United States Pharmacopoeial Convention., 2007).

Tipični hromatogram određivanja oksitetraciklina i ekstrahovani hromatogrami određivanja njegovih nečistoća prikazani su na Slici 26.



Slika 26. Tipični hromatogrami (MRM) koji prikazuju razdvajanje aktivnih komponenti oksitetraciklina i njegovih nečistoća

Ostale studije koje se bave ispitivanjem oksitetraciklina uglavnom se bave određivanjem oksitetraciklina u hrani i ne obaziru se na prisustvo nečistoća.

5.4.1 Validacija metode za određivanje oksitetraciklin-hidrohlorida

Metoda je validirana za određivanje aktivne komponente i njenih nečistoća i primenjene u analizi preparata koji sadrže oksitetraciklin i/ili neomicin kao aktivnu komponentu. Ispitivani farmaceutski preparati su bili u obliku injekcija ili praška, što je omogućilo ispitivanje uticaja različitih matriksa na robustnost metode.

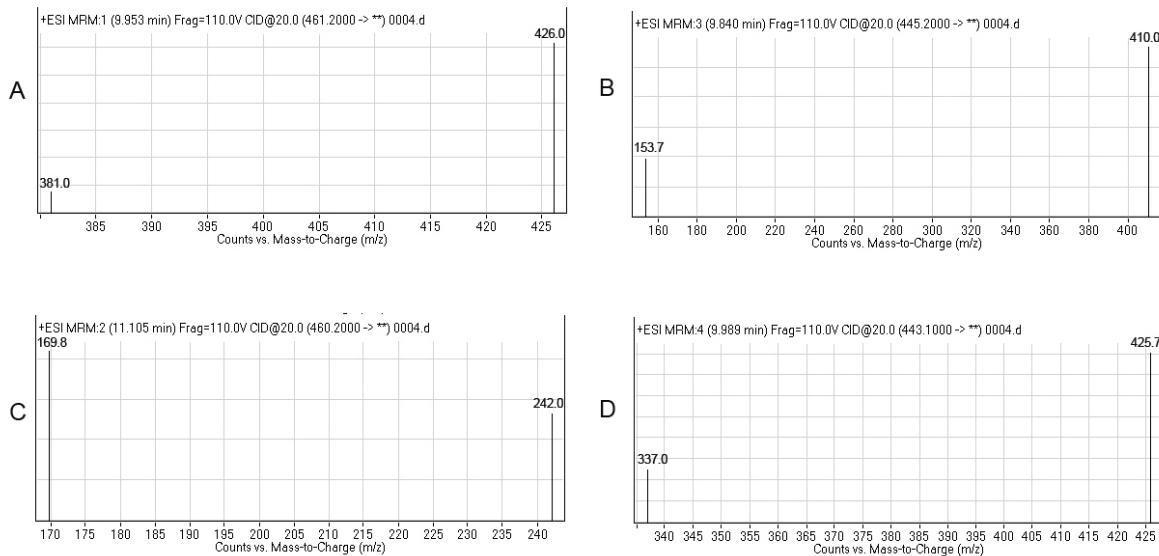
5.4.1.1 Specifičnost metode

Specifičnost metode je garantovana MS/MS tranzicijama analiziranih komponenti. Prekursori i produktni joni ispitivanih komponenti su prikazani u Tabeli 21.

Tabela 21. Prekursori i produktni joni razvijene LC/MS/MS metode za analizu oksitetraciklina

Komponenta	<i>m/z</i>	Kvantifikator jon	Kvalifikator jon
<i>Oksitetraciklin – aktivna komponenta</i>			
Oksitetraciklin	461,2	426,0	381,0
<i>Oksitetraciklin – nečistoće</i>			
Nečistoća A	461,2	426,0	381,0
Nečistoća B	445,2	410,0	153,7
Nečistoća C	460,2	242,0	169,8
Nečistoća D	443,1	425,7	337,0
Nečistoća E	443,1	425,7	337,0
Nečistoća F	443,1	425,7	337,0

Dobijeni MS/MS spektri ispitivanih supstanci su prikazani na Slici 27.



Slika 27. MS/MS spektri oksitetraciklina i njegovih nečistoća

Slika 6A – spektar oksitetraciklina i nečistoće A

Slika 6B – spektar nečistoće B

Slika 6C – spektar nečistoće C

Slika 6D – spektari nečistoće D, nečistoće E i nečistoće F.

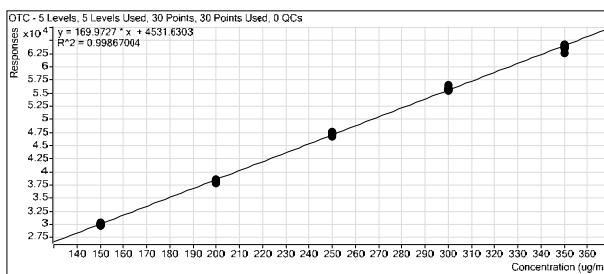
5.4.1.2 Linearnost

Linearnost metode je ispitivana za aktivnu komponentu oksitetraciklin na 6 različitim koncentracijama. Dobijena kalibraciona kriva za radne koncentracije ima koeficijent korelacije veći od 0,99 i prikazana je u Tabeli 22.

Tabela 22. Kalibraciona kriva metode za analizu neomicina

Komponenta	Opseg koncentracija µg/mL	Jednačina	r^2
Oksitetraciklin	10,0 – 120,0	$y=171,36 x+4216$	0,9987

Kalibraciona kriva oksitetraciklina je prikazana na Slici 28.



Slika 28. Kalibraciona kriva oksitetraciklina

5.4.1.3 Preciznost i tačnost metode

Preciznost metode je definisana preko standardne devijacije serije od 6 injektovanja za najnižu, srednju i najvišu koncentraciju iz kalibracionog seta. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 23.

Tačnost metode je računata iz serije od 6 injektovanja uzorka sa dodatom poznatom količinom standarda (laboratorijski pripremljene smeše). Rezultati su izraženi kao procenat *recovery-ja* i prikazani u Tabeli 23 za različite koncentracione nivoe koji odgovaraju 80%, 100% i 120% radne koncentracije.

Tabela 23. Preciznost i tačnost metode za analizu oksitetraciklina

Komponenta	Preciznost			Tačnost		
	Koncentracija µg /mL	RSD [%]	Uzeto µg/mL	Nađeno µg/mL	RSD [%]	Recovery
Oksitetraciklin	10,0	0,80	40,0	40,4±0,3	0,71	101,0%
	50,0	0,71	50,0	50,5±0,5	0,89	101,0%
	120,0	0,88	60,0	60,4±0,5	0,75	100,7%

5.4.1.4 Robustnost

Robustnost metode je testirana variranjem temperature (48 i 52 °C) i procentom TFA u mobilnoj fazi (0,29 i 0,31%). Paramteri jonskog izvora su testirani pod promjenjenim uslovima (temperatura gasa 320 °C, temperatura uparivača 220 °C i pritisak gasa na raspršivaču od 50 i 55 psi). Sve navedene varijacije parametara nisu pokazale značajan uticaj na razdvajanje ispitivanih komponenti.

5.4.1.5 Osetljivost metode

Osetljivost metode je i u ovom slučaju izražena preko LOD i LOQ vrednosti koje iznose 1,84 i 6,14 ng/mL. Kao i kod prethodno razvijenih metoda, i kod ove metode je prisustvo TFA kao poznatog supresora uticalo na smanjenje osetljivosti metode.

5.4.2 Analiza uzoraka oksitetraciklina

Metoda je primenjena u analizi komercijalno dostupnih doziranih oblika koji sadrže oksitetraciklin i/ili oksitetraciklin i neomicin kao aktivnu komponentu. Formulacije su bile u obliku injekcija i praška gde je kod analize praška značajniji uticaj matriksa. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 24.

Tabela 24. Rezultati dobijeni za određivanje sadržaja komercijalno dostupnih formulacija oksitetraciklina

Dozirani oblik	Nađeno, mg		RSD [%], n=6		Procenat deklarisanog sadržaja, %	
	Neomicin	Oksitetraciklin	Neomicin	Oksitetraciklin	Neomicin	Oksitetraciklin
Neocyclin L,A, [®] injekcije	/	198,2±1,4	/	0,63	/	99,1
Neosulfox P [®] prašak	61,7±0,4	40,6±0,3	0,97	0,86	102,8	101,5

Takođe je rađeno određivanje prisustva nečistoća u ispitivanim formulacijama i koncentracija nečistoća je izražena kao procenat aktivne komponente. Rezultati su prikazani u Tabeli 25.

Tabela 25. Rezultati dobijeni za određivanje nečistoća u komercijalno dostupnim formulacijama oksitetraciklina

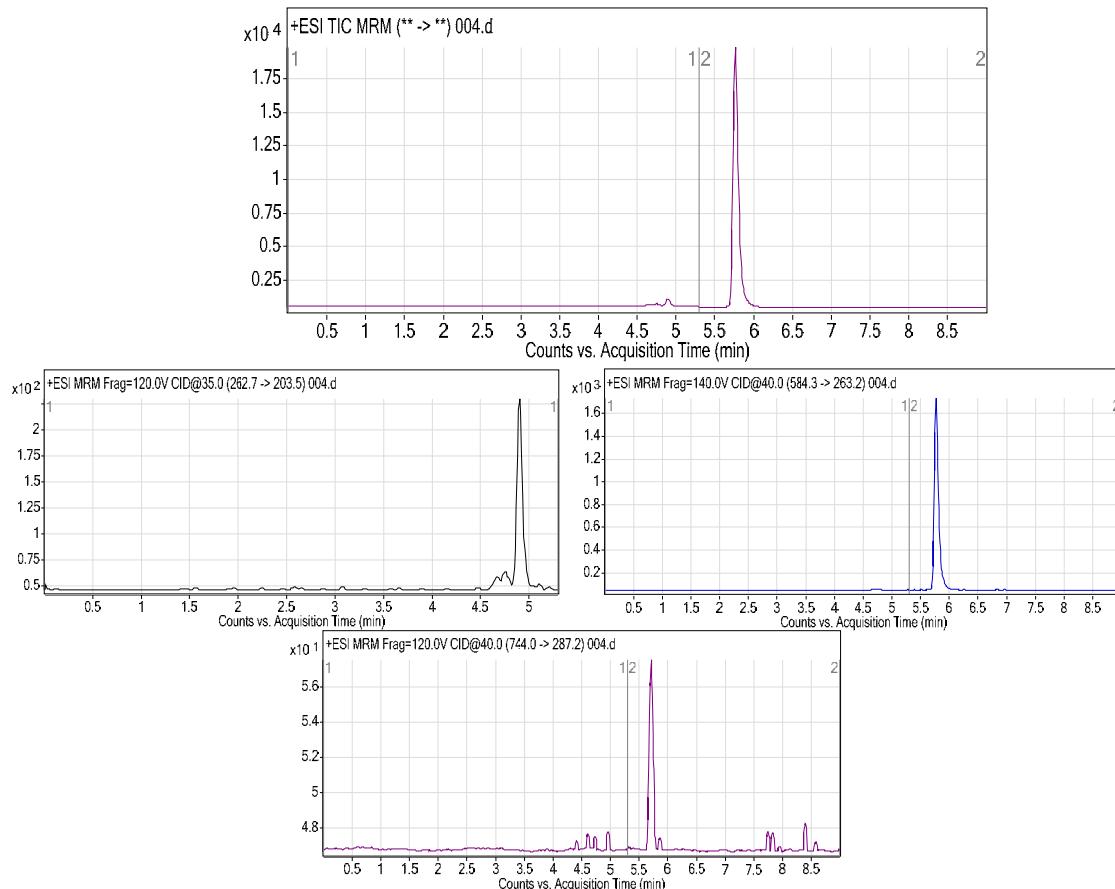
Nečistoća	Neosulfox P [®] prašak	Neocyclin L,A, [®] injekcija
<i>Nečistoće oksitetraciklina</i>		
Nečistoća A	/	/
Nečistoća B	0,18%	0,12%

Nečistoća C	0,86%	0,79%
Nečistoća D	/	/
Nečistoća E	0,11%	/
Nečistoća F	1,14%	0,97%

5.5 Određivanje streptomycin-sulfata

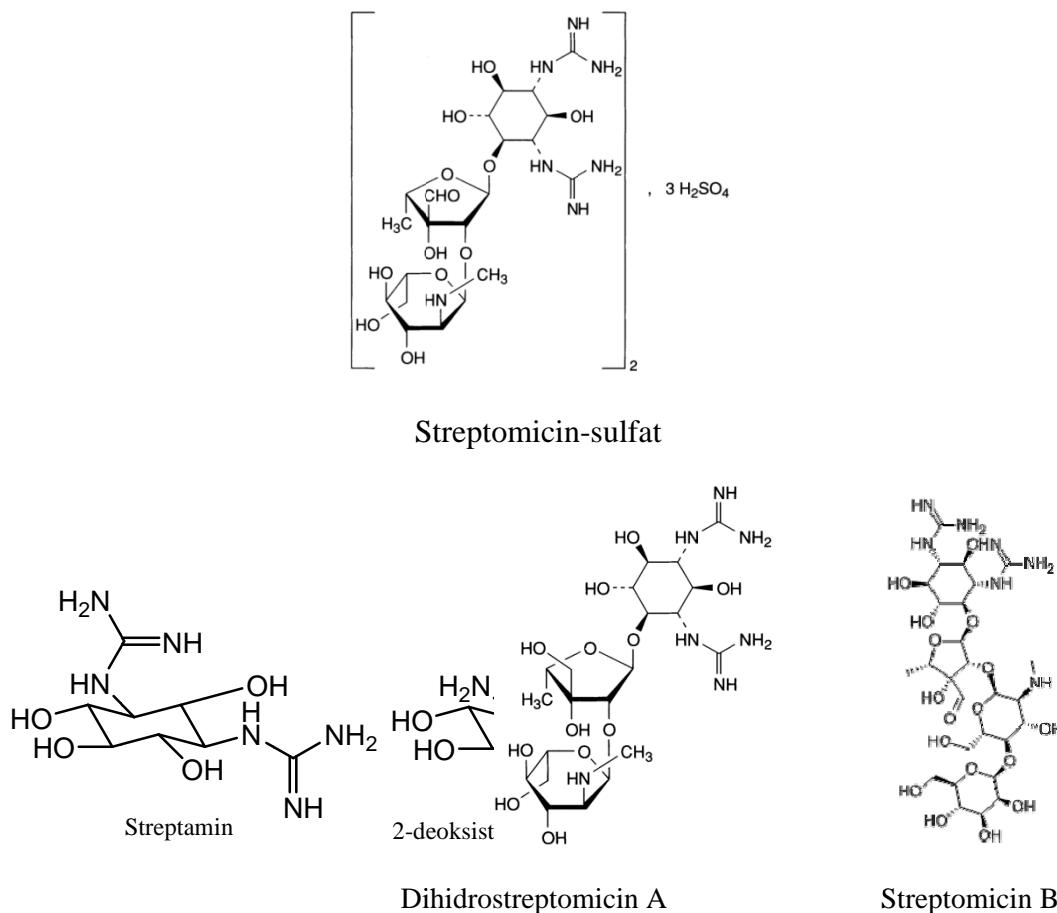
Kao i kod ostalih aminoglikozidnih antibiotika koji su isptivani u ovoj studiji, i kod streptomycin-sulfata je glavni izazov bio primena adekvatne detekcije. Za postizanje ovog razdvajanja korišćena je heptafluorbuterna kiselina (HFBA) u mobilnoj fazi, koja je takođe uzrokovala smanjenje osetljivosti metode (značajan supresor jonizacije). Kao i u prethodnim slučajevima, i kod ove metode zbog njene namene, osetljivost ne predstavlja kritičan parametar.

Tipični hromatogrami razdvajanja streptomycin-sulfata i njegovih nečistoća su prikazani na Slici 29.



Slika 29. Tipični hromatogrami (MRM) koji prikazuju razdvajanje aktivnih komponenti neomicina i njegovih nečistoća

Metoda razvijena za analizu neomicina uključuje parametre za ispitivanje komponenti prikazanih na Slici 30 koje su definisane važeći farmakopejskim propisima.



Slika 30. Struktura streptomicina i njegovih nečistoća

Ostale studije koje su se bavile ispitivanjem streptomicina uglavnom su se bazirale na ispitivanju samo aktivne komponente i to uglavnom u biološkom materijalu. Ovo ispitivanje omogućava analizu streptomicina i njegovih nečistoća primenom selektivnog detektora sa vremenom analize kraćim od 9 min.

5.5.1 Validacije metode za određivanje streptomicina

Metoda je testirana u određivanju kako aktivnih komponenti, tako i nečistoća prisutnih u injekcijama koje sadrži streptomicin kao aktivnu komponentu.

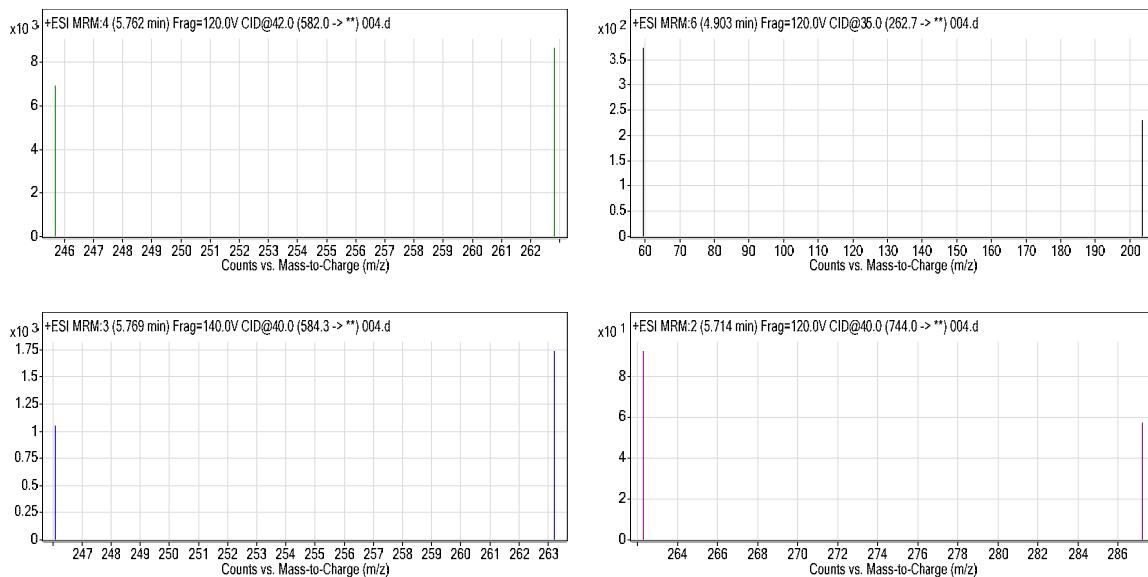
5.5.1.1 Specifičnost metode

Specifičnost metode je garantovana MS/MS tranzicijama analiziranih komponenti. Prekursori i produkt joni ispitivanih komponenti je prikazan u Tabeli 26.

Tabela 26. Prekursori i produktoni razvijene LC/MS/MS metode za analizu streptomicina

Komponenta	<i>m/z</i>	Kvantifikator ion	Kvalifikator ion
<i>Streptomycin – aktivna komponenta</i>			
Streptomycin	582,0	262,8	245,7
<i>Streptomycin – nečistoće</i>			
Streptomycin B - manozidostreptomicin	744,0	262,3	287,2
Dihidrostreptomicin A	584,3	263,2	246,1
Streptamin	262,7	59,6	203,5

Dobijeni MS/MS spektri ispitivanih supstanci su prikazani na Slici 31.



Slika 31. MS/MS spektri streptomicina i njegovih nečistoća – streptomycin, streptamin, dihidrostreptamin i streptomycin B

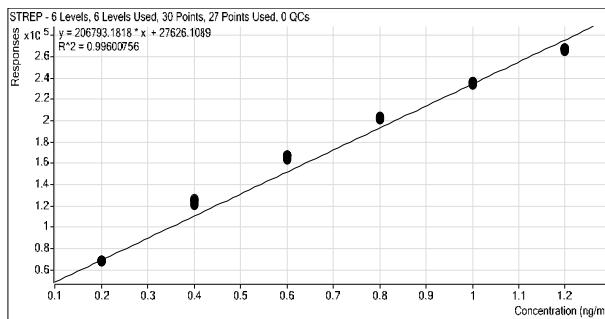
5.5.1.2 Linearnost

Linearnost metode je ispitivana za aktivnu komponentu (streptomycin) na 6 različitim koncentracijama. Dobijena kalibraciona kriva za radne koncentracije ima koeficijent korelacije veći od 0,99 i prikazana je u Tabeli 27.

Tabela 27. Kalibraciona kriva metode za analizu streptomicina

Komponenta	Opseg koncentracija $\mu\text{g/mL}$	Jednačina	r^2
Streptomycin	10,0 – 120,0	$y=206793 x+27626$	0,9960

Kalibraciona kriva neomicina je prikazana na Slici 32.



Slika 32. Kalibraciona kriva streptomicina

5.5.1.3 Preciznost i tačnost metode

Preciznost metode je definisana preko standardne devijacije serije od 6 injektovanja za najnižu, srednju i najvišu koncentraciju iz kalibracionog seta. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 28.

Tačnost metode je računata iz serije od 6 injektovanja uzorka sa dodatom poznatom količinom standarda (laboratorijski pripremljene smeše). Rezultati su izraženi kao procenat *recovery-ja* i prikazani u Tabeli 28 za različite koncentracione nivoe koji odgovaraju 80%, 100% i 120% radne koncentracije.

Tabela 28. Preciznost i tačnost metode za analizu streptomicina

Komponenta	Preciznost			Tačnost		
	Koncentracija μg/mL	RSD [%]	Uzeto μg/mL	Nadeno μg/mL	RSD [%]	Recovery
Streptomycin	10,0	0,52	40,0	40,6±0,1	0,37	101,5%
	50,0	0,55	50,0	50,4±0,4	0,45	100,8%
	120,0	0,43	60,0	60,6±0,1	0,38	101,0%

5.5.1.4 Robustnost

Robustnost metode je testirana variranjem temperature (18 i 22 °C) i vrednosti pH mobilne faze (2,4 i 2,6). Parametri jonskog izvora su testirani pod promenjenim uslovima (temperatura gasa 280 °C, temperatura uparivača 220 °C i pritisak gasa na raspršivaču od 50 i 55 psi). Navedena variranja parametara nisu pokazala značajan uticaj na razdvajanje ispitivanih komponenti.

5.5.2 Analiza uzoraka streptomicina

Metoda je primenjena u analizi komercijalno dostupnog doziranog oblika u kojima je uradjeno određivanje kako sadržaja aktivnih komponenti, tako i prisustvo nečistoća. Dozirani oblik je sadržao streptomycin kao aktivnu komponentu a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 29.

Tabela 29. Rezultati dobijeni za komercijalno dostupne formulacije streptomicina

Dozirani oblik	Nađeno, mg	RSD [% , n=6]	Procenat deklarisanog
			sadržaja, %
	Streptomycin	Streptomycin	Streptomycin
Streptomycin 20%® injekcije	201,4	0,55	100,7

Takođe je radjeno određivanje prisustva nečistoća u ispitivanoj formulaciji i koncentracija nečistoća je izražena kao procenat aktivne komponente. Rezultati su prikazani u Tabeli 30.

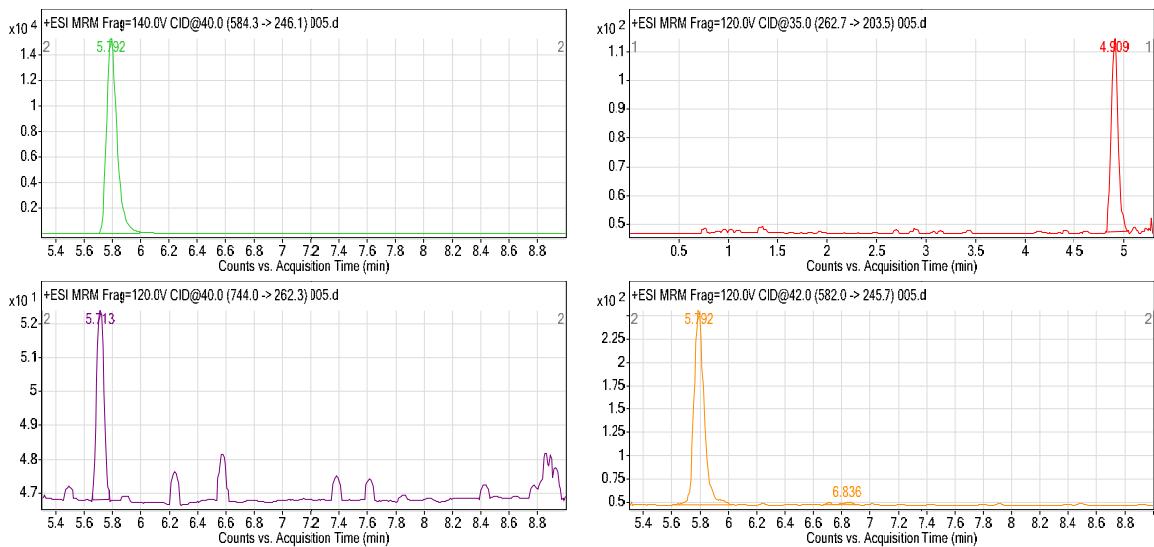
Tabela 30. Rezultati dobijeni za određivanje nečistoća u komercijalno dostupnim formulacijama streptomicina

Nečistoća	Streptomycin 20%® injekcije
<i>Nečistoće streptomicina</i>	
Streptomycin B - manozidostreptomicin	0,05%
Dihidrostreptomicin A	0,93%
Streptamin	0,78%

5.6 Određivanje dihidrostreptomicin-sulfata

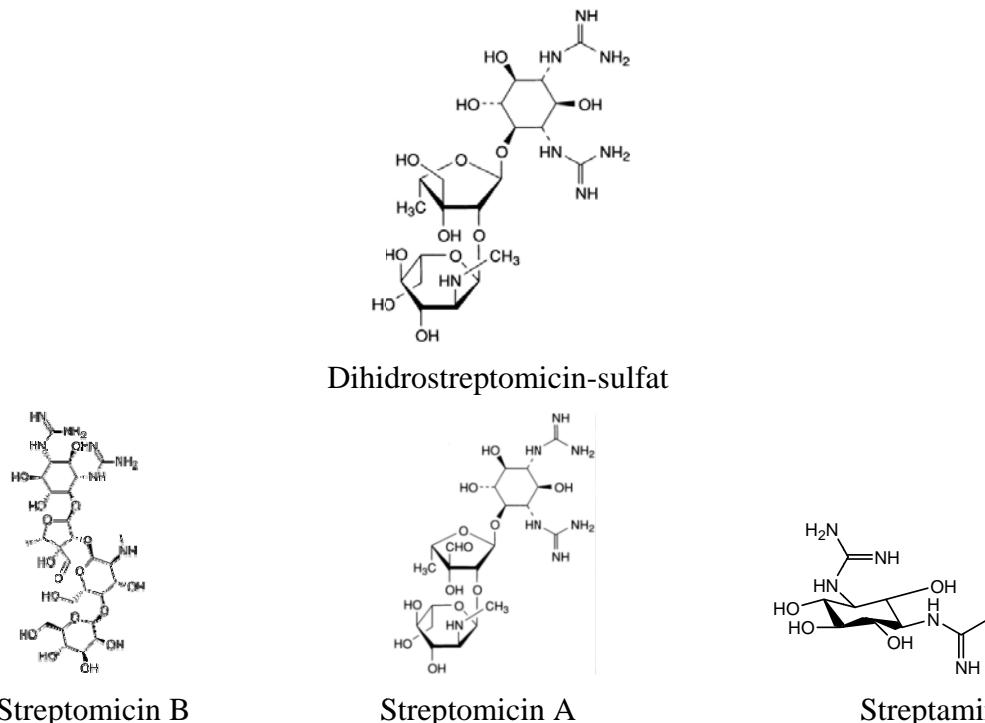
Za ispitivanje dihidrostreptomicina primenjena je takođe tehnika tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom, zbog strukture koja zahteva specifičnu detekciju. Masena spektrometrija je i u ovom slučaju omogućila razdvajanje i pojedinačnu kvantifikaciju i identifikaciju komponenti koje se razlikuju po melkulskim masama a nisu pri tome hromatografski razdvajene. Za postizanje hroamtografskog razdvajanja komponenti korišćena je heptafluorbuterna kiselina (HFBA), koja je takođe uzrokovala smanjenje osetljivosti metode. Kao i u prethodnim slučajevima, i kod ove metode, zbog njene namene, osetljivost ne predstavlja kritičan parametar.

Tipični hromatogrami razdvajanja dihidrostreptomicin-sulfata i njegovih nečistoća su prikazani na Slici 33.



Slika 33. Tipični hromatogrami (MRM) koji prikazuju razdvajanje aktivnih komponenti dihidrostreptomicina i njegovih nečistoća

Metoda razvijena za analizu neomicina uključuje parametre za ispitivanje komponenti prikazanih na Slici 34 koje su definisane važeći farmakopejskim propisima.



Slika 34. Struktura dihidrostreptomicina kao aktivne komponente i njegovih nečistoća

Ostale studije koje su se bavile ispitivanjem dihidrostreptomicina uglavnom su se bazirale na ispitivanju samo aktivne komponente u biološkom materijalu. Ovo ispitivanje

omogućava analizu dihidrostreptomicina i njegovih nečistoća primenom selektivnog detektora sa vremenom analize kraćim od 10 min.

5.6.1 Validacije metode za određivanje dihidrostreptomicina

Metoda je testirana u određivanju kako aktivnih komponenti, tako i nečistoća prisutnih u farmaceutskim formulacijama koje sadrže dihidrostreptomicin kao aktivnu komponentu. Ispitivani farmaceutski preparati su bili u obliku injekcija i bili su u kombinaciji sa β laktamskim antibioticima koji imaju različiti mehanizam delovanja (ovim je postignug širi spektar dejstva).

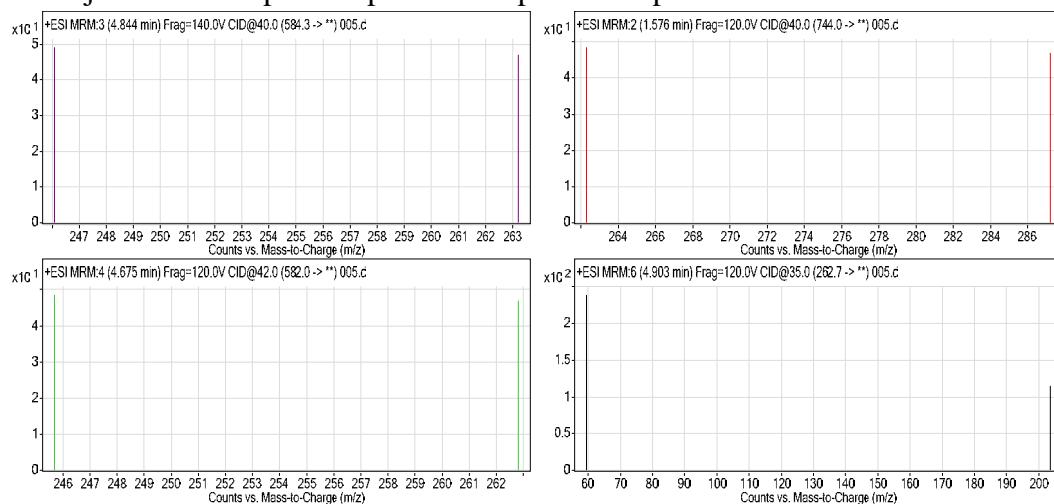
5.6.1.1 Specifičnost metode

Specifičnost metode je garantovana MS/MS tranzicijama analiziranih komponenti. Prekursori i produkt joni ispitivanih komponenti je prikazan u Tabeli 31.

Tabela 31. Prekursori i produkti joni razvijene LC/MS/MS metode za analizu dihidrostreptomicina

Komponenta	<i>m/z</i>	Kvantifikator jon	Kvalifikator jon
<i>Dihidrostreptomicin – aktivna komponenta</i>			
Dihidrostreptomicin	584,3	246,1	263,2
<i>Dihidrostreptomicin – nečistoće</i>			
Streptomycin B	744,0	262,3	287,2
Streptomycin A	582,0	245,7	262,8
Streptamin	262,7	59,6	203,5

Dobijeni MS/MS spektri ispitivanih supstanci su prikazani na Slici 35.



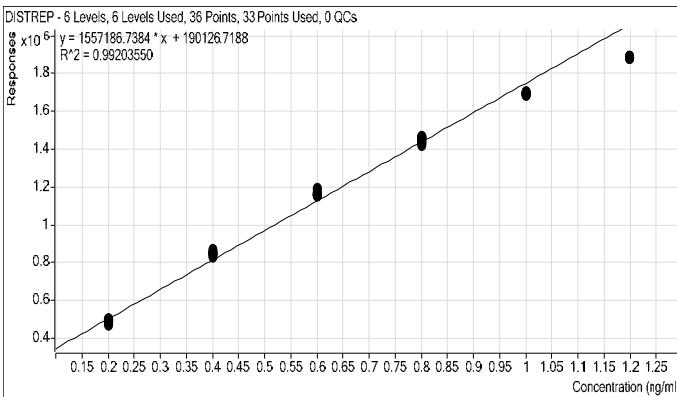
Slika 35. MS/MS spektri dihidrostreptomicina i njegovih nečistoća – dihidrostreptomicin, streptomycin B, streptomycin A i streptamin

5.6.1.2 Linearnost

Linearnost metode je ispitivana za aktivnu komponentu neomicin na 6 različitih koncentracija. Dobijena kalibraciona kriva za radne koncentracije ima koeficijent korelacije veći od 0,99 i prikazana je u Tabeli 32. Kalibraciona kriva neomicina je prikazana na Slici 36.

Tabela 32. Kalibraciona kriva metode za analizu dihidrostreptomicina

Komponenta	Opseg koncentracija µg/mL	Jednačina	r^2
Dihidrostreptomicin	10,0 – 120,0	$y=1557187 x+190126$	0,9920



Slika 36. Kalibraciona kriva dihidrostreptomicina

5.6.1.3 Preciznost i tačnost metode

Preciznost metode je definisana preko standardne devijacije serije od 6 injektovanja za najnižu, srednju i najvišu koncentraciju iz kalibracionog seta. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 33.

Tačnost metode je računata iz serije od 6 injektovanja uzorka sa dodatom poznatom količinom standarda (laboratorijski pripremljene smeše). Rezultati su izraženi kao procenat *recovery-ja* i prikazani u Tabeli 33 za različite koncentracione nivoe koji odgovaraju 80%, 100% i 120% radne koncentracije.

Tabela 33. Preciznost i tačnost metode za analizu dihidrostreptomicina

Komponenta	Preciznost			Tačnost		
	Koncentracija µg /mL	RSD [%]	Uzeto µg/mL	nadjeno µg/mL	RSD [%]	Recovery
Dihidrostreptomicin	10,0	1,48	40,0	39,87±0,01	1,43	99,68%
	50,0	1,24	50,0	50,10±0,03	1,19	100,21%
	120,0	0,24	60,0	59,31±0,07	0,31	98,84%

5.6.1.4 Robustnost

Robustnost metode je testirana variranjem temperature (18 i 22 °C) i vrednosti pH mobilne faze (2,4 i 2,6). Parametri jonskog izvora su testirani pod promenjenim uslovima (temperatura gasa 280 °C, temperatura uparivača 220 °C i pritisak gasa na raspršivaču od 50 i 55 psi). Navedena variranja parametara nisu pokazala značajan uticaj na razdvajanje ispitivanih komponenti.

5.6.2 Analiza uzoraka dihidrostreptomicina

Metoda je primenjena u analizi komercijalno dostupnih doziranih oblika u kojima je uradjeno određivanje kako sadržaja aktivnih komponenti, tako i prisustvo nečistoća. Aktivna komponenta u doziranim oblicima je bila dihidrostreptomicin. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 34.

Tabela 34. Rezultati dobijeni za komercijalno dostupne formulacije dihidrostreptomicina

Dozirani oblik	Nađeno, mg	RSD [% , n=6]	Procenat deklarisanog sadržaja, %
	Dihidrostreptomicin	Dihidrostreptomicin	Dihidrostreptomicin
Neostrep L.A. [®] injekcije	201,4	0,24	100,7
Neostrep [®] injekcije	202,1	0,31	101,05

Takođe je radjeno određivanje prisustva nečistoća u ispitivanim formulacijama i koncentracija nečistoća je izražena kao procenat aktivne komponente. Rezultati su prikazani u Tabeli 35.

Tabela 35. Rezultati dobijeni za određivanje nečistoća u komercijalno dostupnim formulacijama dihidrostreptomicina

Nečistoća	Neostrep L.A. [®] injekcije	Neostrep [®] injekcije
<i>Nečistoće dihidrostreptomicina</i>		
Streptomicin B	/	/
Streptomicin A	0,38	0,43
Streptamin	0,31	0,12

6 Zaključak

Dosadašnje metode određivanja aminoglikozidnih antibiotika i njihovih nečistoća su uglavnom podrazumevale primenu hromatografskih metoda razdvajanja, uz neselektivnu detekciju poput amperometrijske, praćenu pred ili postkolonskom derivatizacijom. Ovakve metode su kao rezultat davale hromatograme na kojima su se mogle detektovati sve komponente iz uzorka, kako one od interesa tako i one koje potiču od matriksa. Postizanje potpunog razdvajanja svih prisutnih komponenti u uzorcima bilo je vremenski zahtevno. Osim problema sa detekcijom, koji su uzrokovani specifičnim strukturama aminoglikozidnih antibiotika, prethodno razvijene metode za analizu ovakvih uzoraka koriste mobilne faze komplikovanog sastava. Ovo je neophodno kako bi se postiglo neophodno razdvajanje komponenti, ali uzrokuje probleme sa održavanjem sistema koji se koriste.

U ovoj studiji razvijena je i validirana metoda za analizu aminoglikozidnih antibiotika – linkomicina, gentamicina, spektonomicina, neomicina, streptomicina, dihidrostreptomicina i njihovih nečistoća i oksitetraciklina iz grupe tetraciklinskih antibiotika. Metode su primenjene za analizu komercijalno dostupnih farmaceutskih formulacija koje se primenjuju u veterinarskoj medicini i sirovina za njihovu proizvodnju. Metode su imale za cilj identifikaciju i kvantifikaciju ispitivanih komponenti u skladu sa važećim propisima za registraciju i puštanje doziranih oblika u promet.

Kao rezultat ovog ispitivanja, dobijeni su sledeći rezultati:

Postavljeni su parametri metode za analizu gentamicina i njegovih nečistoća uz kvantifikaciju svih 5 aktivnih komponenti pojedinačno – C1, C1a, C2, C2a i C2b. Sve ispitivane komponente (5 aktivnih komponenti, 5 nečistoća poznate strukture i 4 dodatne nečistoće) identifikovane i kvantifikovane uz određivanje selektivnih MS/MS tranzicija sa vremenom trajanja analize kraćim od 20 min. Metoda je validirana za primenu u rutinskoj kontroli kvaliteta sa zadovoljavajućim rezultatima za selektivnost, linearost, preciznost, tačnost, robustnost i osetljivost metode. Metoda je primenjena za analizu doziranih oblika za koje su dobijeni zadovoljavajući rezultati prikazani u odeljku sa rezultatima. Metoda je ispitana na preparatima koji sadrže gentamicin ili smešu gentamicina i linkomicina kao aktivne komponente i nije uočena interferencija ovih komponenti pri njihovom određivanju.

Postavljene su metode kojima se mogu analizirati linkomicin i spektinomicin i njihove nečistoće. Postavljeni hromatografski uslovi su rezultirali kompletnim razdvajanjem pojedinačnih komponenti (linkomicina kao aktivne komponente i njegove 4 poznate i 1 nepoznate nečistoće i spektinomicina i njegovih 5 nečistoća). Svim komponentama je potvrđena identifikacija preko MS/MS spektara. Metoda je validirana za primenu u rutinskoj kontroli kvaliteta sa zadovoljavajućim rezultatima za specifičnost, linearost, preciznost, tačnost, robustnost i osetljivost. Analizirani su farmaceutski dozirani oblici koji sadrže

gentamicin i linkomicin ili linkomicin i spektinomicin kao aktivne komponente. Ispitivanjem ovih uzoraka potvrđeno je da nema međusobnih interferencija pri istovremenom ispitivanju ovih aktivnih komponenti i njihovih nečistoća, što je postignutom selektivnom tehnikom i odvajanjem komponenti na osnovu njihovih specifičnih MS/MS tranzicija.

Razvijena je LC/MS/MS metoda za određivanje neomicina i njegovih nečistoća (1 aktivna komponenta i 7 nečistoća) sa vremenom analize kraćim od 25 min. Određene su njihove specifične MS/MS tranzicije i potvrđena je njihova identifikacija. Urađena je validacija metode po ICH regulativi i dobijeni su zadovoljavajući rezultati za linearnost, preciznost, tačnost, robustnost i osetljivost. Metoda je primenjena u analizi doziranih oblika za primenu u veterinarskoj medicini koji sadrže neomicin ili neomicin i oksitetraciklin kao aktivne principe. Ovim ispitivanjem je potvrđeno da nema uzajamnih smetnji pri analizi pojedinačnih komponenti iz uzoraka koji sadrže smešu dva antibiotika iz različitih grupa.

Razvijena je LC/MS/MS metoda za analizu oksitetraciklina (aktivne komponente i 6 nečistoća) sa vremenom trajanja analize od 18 min, uz primenu mobilne faze jednostavnog sastava. Komponente su identifikovane na osnovu selektivnih MS/MS tranzicija. Validacija metode je obuhvatala ispitivanje linearnosti, preciznosti, tačnosti, robustnosti i osetljivosti metode u skladu sa ICH regulativama i dobijeni su zadovoljavajući rezultati. Metoda je primenjena u kontroli kvaliteta formulacija koje sadrže samo oksitetraciklin ili smešu oksitetraciklina i neomicina kao aktivne komponente. Prisustvo matriksa i ostalih komponenti u preparatu nisu ometale pojedinačnu analizu svake od komponenti.

Postavaljeni su parametri za analiziranje streptomicina (aktivne komponente i 3 nečistoće) sa ukupnim vremenom analize od 9 minuta. Kao i kod ostalih metoda, identifikacija je potvrđena specifičnim MS/MS tranzicijama i urađena je validacija metode prema važećim ICH regulativama. Metoda je primenjena za analizu uzoraka koji sadrže streptomycin kao aktivnu komponentu sa zadovoljavajućim rezultatima.

Metoda za analiziranje dihidrostreptomicina je takođe postavljena i testirana za određivanje aktivne komponente i 3 nečistoće sa vremenom analize do 10 minuta. Identifikacija komponenti je potvrđena MS/MS tranzicijama i urađena je validacija metoda prema važećim ICH regulativama. Metoda je primenjena u analizi komercijalno dostupnih doziranih oblika i dobijeni su zadovoljavajući rezultati u skladu za regulativama za ispitivane preparate.

U našem ispitivanju primenili smo selektivni maseni detektor koji je omogućio eliminisanje uticaja ostalih prisutnih komponenti u uzorcima. Ovakva vrsta detekcije je omogućila izbegavanje derivatizacija koje su bile neophodne za detekciju uobičajenim neselektivnim detektorima. Takođe, primenjene su mobilne faze jednostavnog sastava koje su omogućile ionizaciju ispitivanih komponenti, kao i njihovo hromatografsko razdvajanje gde je

to neophodno (u slučajevima komponenti istih molekulske masa). Primenom stacionarne faze gde je veličina čestica bila ispod 2 μm , povećana je sposobnost razdvajanja komponenti u kraćem vremenskom periodu tako da su vremena trajanja analiza značajno skraćena što omogućava smanjenja troškova analize i povećanje produktivnosti laboratorije. Sve razvijene metode su testirane u laboratoriji za rutinsku kontrolu kvaliteta i pokazale su se kao pouzdane, brze i reproduktivne.

Postavljene metode imaju veliki značaj za određivanje aminoglikozidnih antibiotika u doziranim oblicima, kao i za određivanje prisutnih nečistoća. Određivanje sadržaja aktivne komponente u gotovom proizvodu je neophodno zbog adekvatnog doziranja pri primeni gotovih formulacija. Takođe, određivanje prisustva nečistoća u gotovim preparatima je značajno jer njihovo prisustvo može dovesti do smanjenja efikasnosti aktivne komponente, kao i do toksičnih efekata.

7 Izvod

Cilj ove disertacije je bio razvijanje i validacija metoda za analizu aminoglikozidnih antibiotika i njihovih nečistoća u farmaceutskim formulacijama koje se primenjuju u veterinskoj medicini primenom tečne hromatografije kuplovane sa maseno-masenim detektorom. Odabrane ispitivane aktivne komponente iz grupe aminoglikozida su bile linkomicin, gentamicin, spektinomicin, streptomicin, dihidrostreptomicin, neomicin i oksitetraciklin iz grupe tetraciklina kao primer kombinacije različitih grupa antibiotika u jednoj formulaciji. Metode su imale za cilj identifikaciju i kvantifikaciju ispitivanih komponenti uz povećanje selektivnosti i skraćenje vremena analize. primenom razvijenih metoda, dobijeni su sledeći rezultati.

1. Postavljeni su parametri metode za analizu gentamicina i njegovih nečistoća uz kvantifikaciju svih 5 aktivnih komponenti pojedinačno – C1, C1a, C2, C2a i C2b. Sve ispitivane komponente (5 aktivnih komponenti, 5 nečistoća poznate strukture i 4 dodatne nečistoće) identifikovane i kvantifikovane uz određivanje selektivnih MS/MS tranzicija sa vremenom trajanja analize kraćim od 20 min. Metoda je validirana za primenu u rutinskoj kontroli kvaliteta sa zadovoljavajućim rezultatima za selektivnost, linearnost (r^2 0,9875 – 0,9977 za aktivne komponente C1, C1a, C2, C2a i C2b), preciznost (RSD 0,70 – 1,95% za gentamicin C1, 1,11 – 1,97% za gentamicin C1a, 0,74 – 1,79% za gentamicin C2, 0,81 – 1,79% za gentamicin C2a i 1,22 – 2,12% za gentamicin C2b), tačnost (recovery aktivnih komponenti od 96,86 – 102,21% za C1, 95,02 – 97,86% za C1a, 93,91 – 102,84% za C2, 93,91 – 96,57% za C2a i 97,63 – 100,01% za C2b), robustnost i osetljivost metode. Metoda se primenjena za analizu doziranih oblika za koje su dobijeni zadovoljavajući rezultati prikazani u odeljku sa rezultatima.

Metoda je ispitana na preparatima koji sadrže gentamicin ili smešu gentamicina i linkomicina kao aktivne komponente i nije uočena interferencija ovih komponenti pri njihovom određivanju.

2. Postavljena je metoda kojom se mogu analizirati linkomicin i spektinomicin i njihove nečistoće. Postavljeni hromatografski uslovi su rezultirali kompletnim razdvajanjem pojedinačnih komponenti (linkomicina kao aktivne komponente i njegove 4 poznate i 1 nepoznata nečistoća i spektinomicina i njegovih 5 nečistoća). Svim komponentama je potvrđena identifikacija preko MS/MS spektara. Metoda je validirana za primenu u rutinskoj kontroli kvaliteta sa zadovoljavajućim rezultatima za specifičnost, linearnost (r^2 0,9999 za linkomicin i 0,9974 za spektinomicin), preciznost (RSD 0,32 – 0,70% za linkomicin A i 0,71 – 1,18% za spektinomicin), tačnost (recovery od 100,11 – 100,73% za linkomicin A i 97,12 – 100,09% za spektinomicin), robustnost i osetljivost.

Analizirani su farmaceutski dozirani oblici koji sadrže gentamicin i linkomicin ili linkomicin i spektinomicin kao aktivne komponente. Ispitivanjem ovih uzoraka potvrđeno je da nema međusobnih interferencija pri istovremenom ispitivanju ovih aktivnih komponenti i njihovih nečistoća, što je postignutom selektivnom tehnikom i odvajanjem komponenti na osnovu njihovih specifičnih MS/MS tranzicija.

3. Razvijena je metoda za određivanje neomicina i njegovih nečistoća (1 aktivna komponenta i 7 nečistoća) sa vremenom analize kraćim od 25 min. Određene su njihove specifične MS/MS tranzicije i potvrđena je njihova identifikacija. Urađena je validacija metode po ICH regulativi i dobijeni su zadovoljavajući rezultati za linearnost (r^2 0,9989), preciznost (RSD 0,34 – 0,69%), tačnost (recovery 100,7 – 101,5%), robustnost i osetljivost.

Metoda je primenjena u analizi doziranih oblika za primenu u veterinarskoj medicini koji sadrže neomicin ili neomicin i oksitetraciklin kao aktivne principe. Ovim ispitivanjem je potvrđeno da nema uzajamnih smetnji pri analizi pojedinačnih komponenti iz uzoraka koji sadrže smešu dva antibiotika iz različitih grupa.

4. Razvijena je LC/MS/MS metoda za analizu oksitetraciklina (aktivne komponente i 6 nečistoća) sa vremenom trajanja analize od 18 min uz primenu mobilne faze jednostavnog sastava. Komponente su identifikovane na osnovu selektivnih MS/MS tranzicija (Tabela 21). Validacija metode je obuhvatala ispitivanje linearnosti (r^2 0,9987), preciznosti (RSD 0,71 – 0,88%), tačnosti (recovery 100,7 – 101,0%), robustnosti i osetljivosti metode u skladu sa ICH regulativama i dobijeni su zadovoljavajući rezultati.

Metoda je primenjena u kontroli kvaliteta formulacija koje sadrže samo oksitetraciklin ili smešu oksitetraciklina i neomicina kao aktivne komponente. Prisustvo matriksa i ostalih komponenti u preparatu nisu ometale pojedinačnu analizu svake od komponenti.

5. Postavljeni su parametri metode za analizu streptomicina (aktivne komponente i 3 nečistoće) sa vremenom analize do 10 min. Identifikacija komponenti je potvrđena specifičnim MS/MS tranzicijama i urađena je validacija metode sa zadovoljavajućim rezultatima za linearnost (r^2 0,9960), preciznosti (RSD 0,43 – 0,55%), tačnosti (recovery 100,8 – 101,5%) i robustnost.

Metoda je primenjena za analizu preparata koji sadrže streptomycin kao aktivnu komponentu i dobijeni su reproduktivni rezultati u skladu sa regulativama.

6. Razvijena je metoda za analizu dihidrostreptomicina (aktivne komponente i 3 nečistoće) sa trajanjem analize do 10 minuta. Specifičnost metode je potvrđena MS/MS tranzicijama a validacija je podrazumevala ispitivanje linearnosti (r^2 0,9920), preciznosti (RSD 0,24 – 1,48%), tačnosti (recovery 98,84 – 100,21%) i robustnosti sa zadovoljavajućim rezultatima.

7. Razvijena metoda za analizu dihidrostreptomicina je primenjena u ispitivanju farmaceutskih doziranih oblika i dala zadovoljavajuće rezultate. Potvrđeno je da je metoda robustna i pouzdana.

Razvijene metode su primenjene u rutinskoj laboratoriji za kontrolu kvaliteta farmaceutskih formulacija i pokazale su se kao reproduktivne i pouzdane, sa kraćim vremenom analize čime je postignuto smanjenje troškova analize i povećana produktivnost.

8 Summary

The aim of this work was the development and validation of methods by liquid chromatography with tandem mass spectrometry for analysis of aminoglycoside antibiotics and their impurities in pharmaceutical formulations applied in veterinary medicine. Investigated active compounds were lincomycin, gentamicin, spectinomycin and neomycin from the group of aminoglycosides and oxytetracyclin from the group of tetracyclines as an example of a combination of different groups of antibiotics in the same formulation. The aim of the methods was identification and quantification of investigated compounds with an increase in selectivity and the reduction of the analysis time. The following results were obtained:

1. Method parameters for the analysis of gentamicin and its impurities were established with the quantification of all 5 active compound separately – C1, C1a, C2, C2a and C2b. All investigated compounds (5 active compounds, 5 known impurities and 4 additional impurities) were identified and quantified through the selective MS/MS transitions with the analysis time shorter than 20 min. The method was validated for usage in routine quality control with satisfying results of selectivity, linearity (r^2 0,9875 – 0,9977 for active components C1, C1a, C2, C2a and C2b), precision (RSD 0,70 – 1,95% for gentamicin C1, 1,11 – 1,97% for gentamicin C1a, 0,74 – 1,79% for gentamicin C2, 0,81 – 1,79% for gentamicin C2a and 1,22 – 2,12% for gentamicin C2b), accuracy (recovery of active compounds were 96,86 – 102,21% for C1, 95,02 – 97,86% for C1a, 93,91 – 102,84% for C2, 93,91 – 96,57% for C2a and 97,63 – 100,01% for C2b), robustness and sensitivity of the method.
2. The method was applied for the analysis of dosage forms. Adequate results were obtained and represented in the Results section. The method was tested on formulations containing gentamicin or mixtures of gentamicin and lincomycin as active compounds and no interferences of these compounds were noticed during their assay.
3. Methods for the analysis of lincomycin and spectinomycin and their impurities were set up. Established chromatographic conditions resulted with separation of individual components (lincomycin as the active compound and its 4 known and 1 unknown impurity and spectinomycin and its 5 impurities). All components were identified by MS/MS spectra. The methods were validated for routine usage in quality control with satisfying results for specificity, linearity (r^2 0,9999 for lincomycin and 0,9974 for spectinomycin), precision (RSD 0,32 – 0,70% for lincomycin A and 0,71 – 1,18% for spectinomycin), accuracy (recovery 100,11 – 100,73% for lincomycin A and 97,12 – 100,09% for spectinomycin), robustness and sensitivity.
4. Pharmaceutical dosage forms containing gentamicin and lincomycin or lincomycin and spectinomycin as active compounds were analyzed. Testing these samples confirmed

that no interferences occurred during the simultaneous testing of these active compounds and their impurities, which was accomplished by the use of this selective technique and the separation of the compounds based on their specific MS/MS transitions.

5. The method for analysis of neomycin and its impurities (1 active compound and 7 impurities) was developed with an analysis time of 25 min. Their specific MS/MS transitions are determined and their identities were confirmed. Validation according to ICH regulative was done and satisfying results were obtained for linearity (r^2 0,9989), precision (RSD 0,34 – 0,69%), accuracy (recovery 100,7 – 101,5%), robustness and sensitivity.
6. The method was applied in the analysis of dosage forms, for the applications in veterinary medicine, containing neomycin or neomycin and oxytetracycline as active principles. This analysis confirmed that there is no interference between the separate compounds from the samples that contained a mixture of two antibiotics from different groups.
7. LC/MS/MS method for the analysis of oxytetracycline (active component and 6 impurities) was developed with an analysis time of 18 min and with the usage of a mobile phase of a simple composition. Components are identified based on their selective MS/MS transitions. Method validation included the testing of linearity (r^2 0,9987), precision (RSD 0,71 – 0,88%), accuracy (recovery 100,7 – 101,0%), robustness and sensitivity according to ICH regulative and satisfying results were obtained.
8. The method was applied in quality control testing of formulations containing only oxytetracycline or a mixture of oxytetracycline and neomycin as the active compounds. The presence of matrix and the presence of other components in the formulation didn't interfere with the analysis of individual compound.
9. Method parameters for the streptomycin analysis (1 active compound and 3 impurities) were set up with an analysis time of 10 min. Identification of the compounds was achieved by specific MS/MS transitions. Also, method validation was carried out with satisfying results for linearity (r^2 0,9960), precision (RSD 0,43 – 0,55%), accuracy (recovery 100,8 – 101,5%) and robustness.
10. The method was applied for the analysis of a formulation containing streptomycin as the active component and the obtained results were reproductive and in line with the regulative demands.
11. Method for the analysis of dihydrostreptomycin was developed (one active component and 3 impurities) with an analysis time of 10 min. The specificity of the method was confirmed by MS/MS transitions and the validation included a testing of linearity (r^2 0,9920), precision (RSD 0,24 – 1,48%), accuracy (recovery 98,84 – 100,21%) and robustness with satisfying results.

12. The developed method for the analysis of dihydrostreptomycin was applied for the testing of pharmaceutical dosage forms with satisfying results. The method was shown to be robust and reliable.
13. All of the developed methods were applied in a routine laboratory for the quality control of pharmaceutical formulations. The methods were confirmed to be reproductive and reliable, with short analysis time that cuts the analysis costs and increases the productivity and sample throughput.

9 Literatura

- Al-Amoud A. I., C. B. (2002). Determination of gentamicin in urine samples after inhalation by reversed-phase high-performance liquid chromatography using pre-column derivatisation with o-phthalaldehyde. *Journal of Chromatography B* , 769, 89–95.
- Al-Majed, A. (2008). A New LC Method for Determination of Some Aminoglycoside Antibiotics in Dosage Forms and Human Plasma Using 7-Fluoro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole as a Fluorogenic Pre-Column Label. *Chromatographia* , 68, 927–934.
- Bin Guan, D. X. (2007). Determination of neomycin in water samples by high performance anion chromatography with pulsed amperometric detection. *Chinese Chemical Letters* , 18, 201-204.
- Boatto, G. P. (1999). Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 20, 321-326.
- Carretero V., B. C. (2008). Multi-class determination of antimicrobials in meat by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* , 1209, 162–173.
- Clarot I., C. P. (2004). Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* , 1031, 281–287.
- Clarot, I. R. (2005). Analysis of neomycin sulfate and framycetin sulfate by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* , 1087, 236–244.
- Commission, B. P. (2010). *British Pharmacopoeia 2010* (Tom. I-IV). London: he Stationery Office on behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA).
- Council of Europe. (2011.). *European Pharmacopoeia, 7th ed.* Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM).
- Couto, C. M. (2000). Tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline complexation with copper (II). Potentiometric study. *Quimica Nova* , 23 (4), 457-460.
- Curiel H., V. W. (2007). Analysis of underivatized gentamicin by capillary electrophoresis with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 44, 49–56.

- Ghinami C., G. V. (2007). Electrochemical detection of tobramycin or gentamicin according to the European Pharmacopoeia analytical method. *Journal of Chromatography A* , 1139, 53–56.
- Grahek R., Z. K. (2009). Identification of gentamicin impurities by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 50, 1037–1043.
- Gubernator J., D.-K. Z. (2006). A simply and sensitive fluorometric method for determination of gentamicin in liposomal suspensions. *International Journal of Pharmaceutics* , 327, 104–109.
- Heller D.N., P. J. (2005). LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. *Journal of Chromatography B* , 821, 22–30.
- Hubicka U., K. J. (2009). Simultaneous Identification and Quantitative Determination of Selected Aminoglycoside Antibiotics by Thin-Layer Chromatography and Densitometry. *Journal of AOAC International* , 92, 1068–1075.
- Huidobro, A. G. (2009). Rapid analytical procedure for neomycin determination in ointments by CE with direct UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 49, 1303–1307.
- Kent R. Olson, M. F. (2004). *POISONING & DRUG OVERDOSE* (T. fourth edition). New York: McGraw-Hill Companies.
- Kim B-H., L. S. (2003). Reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using pre-column derivatization with phenylisocyanate. *Biomedical Chromatography* , 17, 396–403.
- Krzek J., W. H. (2009). Determination of gentamicin sulfate in injection solutions by derivative spectrophotometry. *Analytical Letters* , 42, 473–482.
- Kühn K. D., W. C. (2008). Evaluation of the stability of gentamicin in different antibiotic carriers using a validated MEKC method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 48, 612–618.
- Kurzawa, M. &.-M. (2004). Electrochemical determination of oxytetracycline in veterinary drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 34, 95-102.
- Lecaroz C., C. M.-P. (2006). Determination of gentamicin in different matrices by a new sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* , 58, 557–563.

- Li B., V. S. (2011). Mass spectrometric characterization of gentamicin components separated by the new European Pharmacopoeia method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 78-84.
- Li, B. V. (2007). Investigation of unknown related substances in commercial neomycin samples with liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 1791–1798.
- Loffler D., T. T. (2003). Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1000, 583–588.
- Lopez M., P. J.-S. (2008). Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC–MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1553–1559.
- Manyanga V., G. O. (2007). Comparison of liquid chromatographic methods with direct detection for the analysis of gentamicin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 257–262.
- Manyanga V., K. K. (2008). Improved liquid chromatographic method with pulsed electrochemical detection for the analysis of gentamicin. *Journal of Chromatography A*, 1189, 347–354.
- Megoulas, N. &. (2004). Enhancement of evaporative light scattering detection in high-performance liquid chromatographic determination of neomycin based on highly volatile mobile phase, high-molecular-mass ion-pairing reagents and controlled peak shape. *Journal of Chromatography A*, 1057, 125–131.
- Morovjain Gy., C. P.-K. (1998). HPLC Determination of Colistin and Aminoglycoside Antibiotics in Feeds by Post-Column Derivatization and Fluorescence Detection. *Chromatographia*, 48, 32-37.
- N. Megoulas, M. K. (2004). Development and validation of a novel LC/ELSD method for the quantitation of gentamicin sulfate components in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 73–79.
- Oertel, R. N. (2004). Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *Journal of Chromatography A*, 1058, 197–201.
- Oka, H. I. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882, 109–133.

- Pendela M., A. E. (2004). Development of a liquid chromatographic method for ear drops containing neomycin sulphate, polymyxin B sulphate and dexamethasone sodium phosphate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 751–757.
- Peru K. M., K. S. (2006). Development of a hydrophilic interaction chromatography–mass spectrometry assay for spectinomycin and lincomycin in liquid hog manure supernatant and run-off from cropland. *Journal of Chromatography A*, 1107, 152–158.
- Remers, J. N. (2004). *Wilson and Gisvold's, Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. Eleventh Edition*. Lippincott: Raven Publishers.
- Sin D. W-M., W. Y.-C.-B. (2004). Quantitative analysis of lincomycin in animal tissues and bovine milk by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 651–659.
- Srisom, P. L. (2007). Simultaneous determination of neomycin sulfate and polymyxin B sulfate by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 1013–1018.
- Tagiri-Endo M., S. S. (2009). Rapid determination of five antibiotic residues in swine wastewater by online solid-phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 1367–1375.
- Tagiri-Endo, M. S. (2009). Rapid determination of five antibiotic residues in swine wastewater by online solid-phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 1367–1375.
- The Stationery Office. (2009). *British Pharmacopoeia*. London: The Stationery Office.
- Turnipseed, S. C. (2009). Analysis of aminoglycoside residues in bovine milk by liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry after derivatization with phenyl isocyanate. *Journal of Chromatography B*, 877, 1487–1493.
- United States Pharmacopoeial Convention. (2007). *United States Pharmacopeia-USP, 30th ed.; and National Formulary-NF, 25th ed.* Rockville: United States Pharmacopoeial Convention.
- Valoran P. Hanko, J. S. (2007). Determination of neomycin sulfate and impurities using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 131–141.
- Wang J., H. X. (2006). Determination of spectinomycin hydrochloride and its related substances by HPLC–ELSD and HPLC–MSn. *Journal of Chromatography B*, 834, 178–182.

- Wang M-J., H. C.-Q. (2006). Analysis of Spectinomycin by HPLC with Evaporative Light-Scattering Detection. *Chromatographia* , 63, 255–260.
- Williams D.A, T. L. (2008). *Foye's, Principles of Medicinal Chemistry, Sixth Edition*. Lippincott: Williams & Wilkins Publishers.
- W-M. Sin D., W. Y.-C.-B. (2004). Simultaneous determination of lincomycin and virginiamycin M1 in swine muscle, liver and kidney by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* , 517, 39–45.
- W-X. Zhu, J.-Z. Y.-F.-S. (2008). Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps. *Journal of Chromatography A* , 1207, 29–37.
- Xi L. L., Z. P. (2009). Copper modified platinum electrode for amperometric detection of spectinomycin sulfate by anion-exchange chromatography. *Chinese Chemical Letters* , 20, 1245–1247.
- Yan H. D., X. P. (2009). Analysis of spectinomycin in fermentation broth by reversed-phase chromatography. *Chemical Papers* , 63, 635–640.
- Yuan L. L., W. H. (2005). Direct determination of gentamicin components by capillary electrophoresis with potential gradient detection. *Electrophoresis* , 26, 196–201.
- Zawilla N.H., D. J. (2006). Analysis of neomycin using an improved liquid chromatographic. *Journal of Chromatography B* , 833, 191–198.
- Zhu, W. Y. (2008). Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps. *Journal of Chromatography A* , 1207, 29–37.

10 Biografija

Lični podaci

Ime i prezime	Katarina Vučićević-Prčetić
E-mail	katarina.vucicevic@gmail.com
Državljanstvo	Republika Srbija
Datum i mesto rođenja	03. maj 1976. god., Čačak

Obrazovanje i radno iskustvo

Stečena kvalifikacija i organizacija u kojoj je obavljeno obrazovanje	Diplomirani farmaceut, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu (Oktobar 1995 – Jul 2000; prosečna ocena u toku studiranja 8,77)
Radno iskustvo	<p>2004. – danas, inženjer servisa i prodaje u „DSP Chromatography“ d.o.o., autorizovanog distributera za analitičku instrumentaciju Agilent Technologies. Zadužena za poslove prodaje i servisa analitičke opreme, izvršenje kvalifikacionih usluga koje obuhvataju kreiranje kvalifikacione dokumentacije, praćenje važećih propisa i njihovu primenu, aplikativnu podršku korisnicima za razvoj analitičkih metoda, pomoć u pripremi registracione dokumentacije kao i pomoć u pripremi prateće dokumentacije potrebne prema zahtevima dobre laboratorijski i proizvođačke prakse (GLP i GMP), održavanje edukativnih seminara i demonstracija za primenu opreme i analitičkih metoda, praćenje i priprema nacionalnih i međunarodnih tendera u tehničkom i administrativnom delu.</p> <p>2000. – 2004. asistent-pripravnik u Institutu za farmaceutsku hemiju i analitiku lekova, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Opis posla: nastavni rad sa ciljem sticanja znanja i veština studenata (redovnih i specijalističkih studija) u oblasti farmaceutske hemije i kontrole lekova, poslovi sa trećim licima – sprovođenje kontrole kvaliteta lekova, učešće na naučno-istraživačkim i stručnim projektima i naučni rad.</p> <p>2000 - 2001. pripravnički staž za diplomiranog farmaceuta, Apotekarska ustanova Beograd sa položenim stručnim ispitom</p>

Znanje jezika

Maternji jezik Srpski

Drugi jezik

	Razumevanje		Razumevanje		Pisanje
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+

Profesionalna orijentacija/interesovanje

Kontrola i proizvodnja lekova i upravljanje kvalitetom i rizicima u farmaceutskoj industriji, komunikacija u riziku.

Regulativa u farmaceutskoj industriji, kontroli i proizvodnji lekova.

Primena hromatografskih tehnika u farmaceutskoj laboratorijskoj praksi.

Poznavanje administrativnih propisa i priprema dokumentacije za nacionalne i međunarodne tendere.

Obuke iz oblasti tehnika tečne hromatografije (HPLC), tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC MSD), gasne hromatografije (GC), gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC MSD) i spektrofotometrije (UVVis), kvalifikacionih usluga i regulativa.

11 Bibliografija

Radovi

Radovi pod rednim brojem 5-6 su deo ove doktorske disertacije

1. Popovic G, Cakar M, Vucicevic K, Vladimirov S, Agbaba D, Comparison of HPTLC and HPLC for determination of econazole nitrate in topical dosage forms, Journal of Planar Chromatography, 2004, vol. 17
2. Agbaba D, Vucicevic K, Marinkovic V, Determination of nisoldipine and its impurities in pharmaceuticals, Chromatographia 2004, 60
3. Vucicevic K, Agbaba D, Vladimirov S, Determination of lincomycine-hydrochloride and preservatives in dosage forms by HPLC method, III Congress of pharmacist of Yugoslavia with international participation, October 29 – November 2, 2002, Belgrade, Yugoslavia, Arhiv za farmaciju 4 (500-501) 2002
4. Vucicevic K, Popovic G, Nikolic K, Vovk I, Agbaba D, An experimental design approach to selecting optimum HPLC conditions for the determination of 2-arylimidazoline derivatives, Journal of liquid chromatography & related technologies, 2009, Vol 32, p656-667
5. Vučićević-Prčetić K., Cservesnák R., Radulović N, Determination of Neomycin and Oxytetracycline in the Presence of their Impurities in Veterinary Dosage Forms by High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, Journal of AOA C International, 2011, Vol. 94, No. 3
6. Vučićević-Prčetić K., Cservesnák R., Radulović N, Development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of gentamicin, lincomycin, and spectinomycin in the presence of their impurities in pharmaceutical formulations, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, Vol. 56, page 736– 742

Saopštenja

1. Agbaba D, Vucicevic K, Marinkovic V, Application of planar chromatography in pharmaceutical purity testing: critical overview, International symposium “Planar chromatography today 2002”, October 4-6, 2002, Novo Mesto, Slovenia
2. Vucicevic K, Filipovic D, Agbaba D, Vladimirov S, HPLC determination of atropine and pilocarpine and their degradation products in pharmaceutical formulations, XXVII symposium “Chromatographic methods of investigating the organic compounds”, June 4-6, 2003, Katowice – Szczyrk, Poland
3. Vucicevic K, Filipovic D, Agbaba D, Vladimirov S, HPLC method for determination of benzalkonium chloride in eye drops, Third Congress on Pharmacy of Macedonia with international participation, October 5-9, 2003, Ohrid, Macedonia

4. Vucicevic K, Eric S, Popovic G, Agbaba D, Reversed phase HPLC in quantitative structure-properties relationships studies of imidazolines as alpha adrenergic agonists, 15th international symposium on pharmaceutical and biomedical analysis PBA 2004, May 2-6, 2004, Florence, Italy
5. Vucicevic-Prcetic K, Kujundzic S, Proposed method for screening of precursors and drug of abuse from whole blood extract, V Congress of pharmacist of Serbia, Belgrade, 13-17. October 2010.

Usmena predavanja

1. Slavica B, Vucicevic K, Workshop Rapid Resolution HPLC methods, Forth Congress on Pharmacy of Macedonia with international participation, October 2007, Ohrid, Macedonia
2. Vucicevic K, Workshop Modern analytical techniques, XXVIII symposium about medicinal and aromatic herbs, Pharmaceutical society of Serbia, Section for medicinal herbs, Vršac 8-10.10.2008.
3. Vucicevic K, Kujundzic S, Application of different analytical techniques in monitoring of concentration of drugs and their metabolites, Week of hospital clinicak pharmacology, Serbian medical society, Belgrade, 26-27. novembar 2009.
4. Vucicevic-Prcetic K, Kujundzic S, Application of new analytical techniques in toxicological testing, oral prezentation, 10. Congress of toxicologist of Serbia with international participation, Palic 22 - 25. September 2010.
5. Vucicevic-Prcetic K, Kujundzic S, Proteomics research – new approach, oral presentation, II Week of hospital clinical pharmacology workshop with international participation, Serbian medical society, Belgrade, 24. November 2010.